

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. Juni 2003 (05.06.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/046190 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/86,
5/10

[DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, 82152 Planegg/Martin-
sried (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/13532

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
29. November 2002 (29.11.2002)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖRER, Markus
[DE/DE]; Röntgenstrasse 15, 82152 Martinsried (DE).
DUBIELZIG, Ralf [DE/DE]; Zitzelsbergerstrasse 9a,
81476 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, Postfach 860 880, 81635 München
(DE).

(30) Angaben zur Priorität:
60/334,571 30. November 2001 (30.11.2001) US

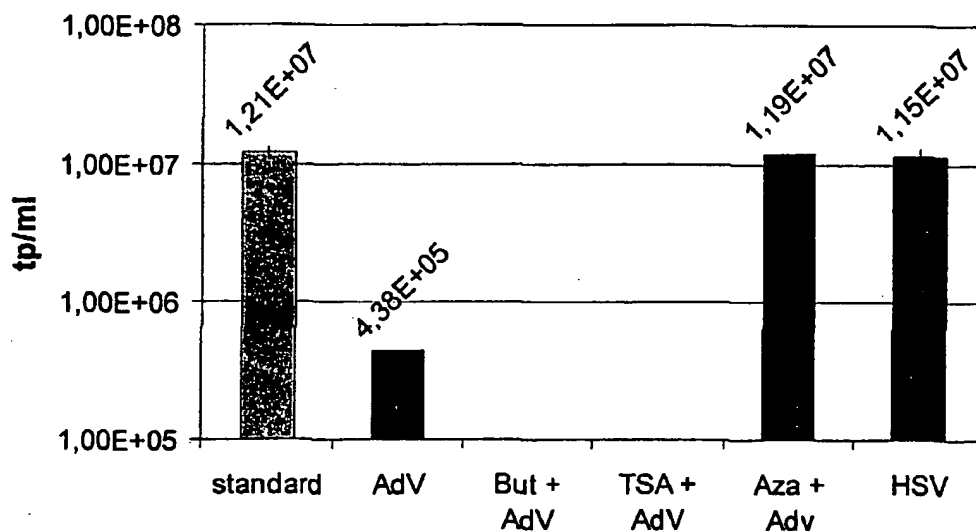
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MEDIGENE AKTIENGESELLSCHAFT

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: OPTIMIZED PRODUCTION OF VIRAL VECTORS DERIVED FROM PAROVIRUSES IN PACKAGING AND PRO-
DUCTION CELLS BY HSV INFECTION OR TREATMENT WITH DNA METHYLATION INHIBITORS

(54) Bezeichnung: OPTIMIERTE HERSTELLUNG VON VIRALEN, VON PARVOVIREN ABGELEITETEN VEKTOREN IN
VERPACKUNGS- UND PRODUKTIONSZELLEN DURCH HSV-INFEKTION ODER BEHANDLUNG MIT INHIBITOREN
DER DNA-METHYLIERUNG



(57) Abstract: The invention relates to uses and methods enabling the production yield of viral vectors derived from piroviruses to be improved by using DNA methylation inhibitors and/or Herpes viruses in the production of viral vectors derived from parvoviruses.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Verwendungen und Verfahren, mit denen die Ausbeute bei der Herstellung viraler, von Parvoviren abgeleiteter Vektoren dadurch verbessert werden kann, indem DNA-Methylierungsinhibitoren und/oder Herpes-Viren bei der Herstellung viraler, von Parvoviren abgeleiteter Vektoren verwendet werden.

BEST AVAILABLE COPY



KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Optimierte Herstellung von viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektoren
in Verpackungs- und Produktionszellen durch HSV-Infektion
oder Behandlung mit Inhibitoren der DNA-Methylierung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Mittel zum Erhöhen der Ausbeute bei der Herstellung viraler Vektoren, die von Parvoviren abgeleitet sind.

Genetisch modifizierte Viren haben sich für den Gentransfer in Säugerzellen, insbesondere in humane Zellen als geeignet herausgestellt. Dazu werden die Viren in
10 aller Regel genetisch modifiziert, um sie als Träger (virale Vektoren) für den Gentransfer eines oder mehrerer Transgene verwenden zu können.

Beispiele derzeit verwendeter viraler Vektoren sind Vektoren, die von Adenoviren, Herpes-Viren, Retroviren oder von Parvoviren, wie den adeno-assoziierten
15 Viren (AAV) abgeleitet sind (Pfeifer und Verma (2001) Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177-211).

Die Familie der Parvoviren (Parvoviridae) umfasst die kleinsten (18-26 nm), nicht
20 von einer Membran umhüllten Viren. Das Genom der Parvoviren enthält eine lineare Einzelstrang DNA, wobei + und - Stränge in gleichem Verhältnis verpackt werden. Die Familie der Parvoviren gliedert sich in zwei Unterfamilien, die Parvovirinae und die Densovirinae. Die Parvovirinae wiederum umfassen drei Genera, die Parvoviren, die Erythroviren und die Dependoviren. AAV gehört zu den
25 Dependoviren und ist ein humanes Virus, welches entweder in Form eines Provirus in das Genom integriert vorliegt oder eine lytische Infektion verursacht. Aus diesem Grund ist AAV als allgemeiner Transduktionsvektor von Säugerzellen von Interesse. Von AAV sind zurzeit zahlreiche Serotypen bekannt, z.B. AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 und AAV-8 (Gao G-P et al.

- 2 -

(2002) PNAS 99:11854-9). Es ist zu erwarten, dass in Zukunft weitere AAV Serotypen isoliert werden. AAV-2 z.B. enthält eine lineare Einzelstrang DNA von ca. 4,7 Kilobasen (kb) Länge. Die viralen Partikel, die aus drei viralen Proteinen, VP1, VP2 und VP3 zusammengesetzt sind, enthalten einen Strang viraler DNA, welcher entweder die eine Polarität (+) oder die andere Polarität (-) besitzt. Beispiele für von AAV abgeleitete virale Vektoren sind allgemein bekannt. Möglichkeiten zu ihrer Herstellung werden im Anschluss beschrieben. Erfindungsgemäß eingeschlossen sind ebenfalls Kapsidmutanten dieser Serotypen. Unter "Kapsidmutanten" wird im Rahmen dieser Erfindung verstanden, dass die AAV-Partikel ein mutiertes Kapsid enthalten können. Dieses kann eine Mutation einer oder mehrerer Aminosäuren, eine oder mehrere Deletionen und/oder Insertionen umfassen. Entsprechende Beispiele sind für den Fachmann aus folgenden Literaturstellen bekannt: WO 99/67393, Grifman M. et al. (2001) Mol. Ther. 3(6):964-75, Wu P. et al. (2000) J. Virol 74(18):8635-47, Chandler LA et al. (2000) Mol. Ther. 2(2):153-60, Hirate RK and Russell DW (2000) J. Virol. 74(10):4612-20, Girod A et al. (1999) Nat. Med. 5(12):1438, Girod A et al. (1999) Nat. Med. 5(9):1052-6 oder in Bartlett JS et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17(2):181-6.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt bei der Entwicklung geeigneter lebender Vektoren sind Sicherheitsaspekte in Verbindung mit der Verwendung der genannten Vektoren in der Gentherapie am Menschen. Aus diesem Grund werden im Allgemeinen "replikationsdefiziente" Viren entwickelt, d.h. Viren, die zwar eine Zelle infizieren und die Transgene in diese Zelle transferieren können, die aber nicht in der Lage sind, sich in diesen Zellen zu vermehren. Dies wird zum Beispiel dadurch erreicht, dass Gene, die für die Virusvermehrung wichtig sind, deletiert werden, z.B. Gene, die für Strukturproteine kodieren und, wo dies angebracht ist, an deren Stelle das Transgen oder die Transgene eingebaut werden. Zur Produktion der für die Gentherapie benötigten nicht-vermehrbaren Viren sind dann weitere Gene notwendig, die das Fehlen der Strukturproteingene in der Zelle kompensieren.

Im Allgemeinen werden für die Bildung von Viruspartikeln die folgenden Gene benötigt:

- 5 a) Gene, die auf dem Virusgenom natürlicherweise vorkommen, aber im rekombinanten Virus (teilweise) nicht mehr vorhanden sein können. Im Falle von AAV sind dies die rep- und cap-Gene. Nukleinsäuresequenzen, die derartige Gene tragen, werden im Rahmen dieser Erfindung als „Helferkonstrukte“ bezeichnet.
- 10 b) Gene, die auf dem Genom anderer Viren (sog. „Helferviren“) vorkommen oder Gene, die auf dem Genom der Zelle vorkommen, in der die Viruspartikel hergestellt werden. Nukleinsäuresequenzen mit derartigen Genen werden im Rahmen dieser Erfindung als „Helfergene“ bezeichnet. Es gibt virale Vektoren, bei denen derartige Helfergene zur Partikelbildung nicht erforderlich sind.

15 Insbesondere werden unter Helfergenen im Sinne der vorliegenden Erfindung bei der Herstellung von AAV-Vektoren die Gene der Helferviren von AAV und/oder zelluläre Gene verstanden, deren Genprodukte für die Replikation der AAV notwendig sind bzw. diese fördern. Beispiele für adenovirale Helfergene sind beispielsweise die Gene E1A, E1B, E4, E2A und VA. E1A ist dabei für die Transaktivierung des AAV p5 Promotors erforderlich. Die Genprodukte E1B und E4 dienen hierbei zur Verstärkung der AAV mRNA-Akkumulation. Die Genprodukte E2A und VA dienen der Verstärkung des AAV mRNA-Spleißens sowie der Translation. Ferner sind als Helfergene

20 Herpes Simplex Virus (HSV) Helfergene eingeschlossen. Dies können beispielsweise die sieben Replikationsgene UL5, UL8, UL9, UL29, UL30, UL42 und UL52 sein. UL 5, 8 und 52 bilden den HSV Helikase-Primase Komplex, UL29 kodiert für das Einzelstrang-DNA Bindungsprotein, UL42 für ein Doppelstrang-DNA Bindungsprotein, UL30 kodiert für die HSV DNA Polymerase und UL9 kodiert schließlich für ein Protein, welches an den HSV Replikationsursprung bindet (siehe Weindler FW and Heilbronn R (1991) J. Virol.

25

30

65(5):2476-83). Die Verwendung des Helfervirus an Stelle der einzelnen Helfergene, beispielsweise des Adenovirus-Typ 5 (Ad5), ist besonders vorteilhaft, weil dies der natürlichen Situation der AAV-Vermehrung in Gegenwart von Helferviren am nächsten kommt und somit die Verpackung von rAAV-Partikeln sehr effizient ist. Andere Helferviren sind beispielsweise Herpesviren oder Vacciniaviren.

c) Nukleinsäuren, die die heterologe, d.h. Virus-fremde DNA enthalten, die durch den viralen Vektor in andere Zellen eingebracht werden soll. Diese DNA ist in der Regel durch Virus-eigene Sequenzen wie z.B. ITR's flankiert, die für die Replikation der DNA und für die Partikelbildung wichtig sind. Nukleinsäuresequenzen, welche die heterologe DNA zusammen mit den genannten Virus-eigenen Sequenzen wie ITR's umfassen, werden im Rahmen dieser Erfindung als „Vektorkonstrukte“ bezeichnet.

Im folgenden wird die Herstellung viraler Vektoren am Beispiel von AAV näher erläutert:

Eine Methode zur Herstellung relativ großer Mengen an rAAV-Partikeln ist die Co-Transfektion einer eukaryotischen Zelle mit zwei rekombinanten AAV-Plasmiden in Form einer Mischung und Infektion mit einem Helfervirus (Chiorini, J. A. et al. (1995) Human Gene Therapy 6:1531). Das erste rekombinante AAV-Konstrukt enthält ein oder mehrere Transgen(e) welche(s) von zwei ITR-Regionen begrenzt, d.h. flankiert wird (werden) (Vektorkonstrukt). Das zweite rekombinante AAV-Konstrukt, das Helferkonstrukt, enthält die AAV-Gene, welche für die Herstellung der Viruspartikel notwendig sind (rep- und cap- Gene). Die Abwesenheit der ITR-Regionen im Helferkonstrukt sollte die Verpackung der rep- und cap-Gene in AAV-Partikel und damit die Bildung von unerwünschtem Wildtyp AAV verhindern. Anschließend werden geeignete Zellen, welche sowohl für das rekombinante AAV Konstrukt, als auch für das Helfervirus permissiv, d.h. zugänglich sind, mit den beiden AAV-Konstrukten transfiziert. Solche permissi-

- 5 -

- ven Zellen sind z.B. HeLa-Zellen. Nach der Infektion der transfizierten Zellen mit Helferviren wie z.B. Adenovirus, werden die AAV-Gene exprimiert, die transgene DNA wird repliziert und die rekombinanten AAV-Partikel (rAAV-Partikel) werden verpackt und zusammengesetzt. Die rAAV-Partikel enthalten das (die)
- 5 Transgen(e), auf beiden Seiten flankiert durch die ITR-Regionen, in Form einer einzelsträngigen DNA. Zur gleichen Zeit repliziert das Helfervirus in diesen Zellen, was im Fall der Verwendung von Adenoviren als Helferviren im allgemeinen zu Lyse und Tod der infizierten Zellen nach wenigen Tagen führt. Die rAAV-Partikel und auch die gebildeten Helferviren, werden in diesem Zusammenhang
- 10 teilweise in das Zellkulturmedium freigesetzt oder verbleiben in den lysierten Zellen. Ein Review über die Verwendung von AAV als allgemeinen Transduktionsvektor für Säugerzellen findet sich z.B. bei Muzyczka, N. (1992) in Current Topics in Microbiology and Immunology 158:97.
- 15 Ein erheblicher Nachteil bei dieser Art der Herstellung von rAAV-Partikeln besteht darin, dass Helfer- und Vektorkonstrukte für jeden Herstellungsgang produziert werden müssen, was unter GMP Bedingungen ein kostspieliger Vorgang ist. Auch Plasmidtransfektionen sind Schritte, die in einem kommerziellen Produktionsvorgang vermieden werden sollten.
- 20 Um die Transfektion von Plasmiden zu vermeiden, wurden Verpackungszelllinien entwickelt, die Kopien des gesamten AAV-Genoms ohne die flankierenden ITRs und mit rep- und cap-Genen unter Kontrolle ihrer natürlichen viralen Promotoren enthalten. Diese Promotoren, P5, P19 und P40, sind in Abwesenheit einer Infekti-
- 25 on durch ein Helfervirus inaktiv (Inoue and Russels (1998) J. Virol. 72:7024-7031; Gao et al. (1998) Human Gene Therapy 9:2353-2362). Nach Infektion mit einem Helfervirus wird die stabil transfizierte Verpackungszelllinie (z.B. HeLa Zelllinie) zur Expression der AAV-Gene induziert. Solche Zelllinien können für die Herstellung großer Mengen an AAV, speziell für kommerzielle Anwendungen
- 30 verwendet werden (Allen et al. (1997) J. Virol. 71:6816-6822; Wang et al. (1998) J. Virol. 72:5472-5480).

Ein Nachteil bei der Verwendung der publizierten Verpackungszelllinien zur Herstellung von viralen Vektoren ist die Tatsache, dass nur ein Rekombinationsereignis mit dem Vektorgenom für die Entstehung von Wildtyp-AAV (rcAAV) erforderlich ist, weshalb solche Zelllinien für den Einsatz in der Gentherapie aufgrund
5 des unüberschaubaren Risikos nicht in Frage kommen.

Um die Produktion von rAAV in großem Maßstab zu erlauben, dabei aber die Entstehung von Wildtyp-AAV im Wesentlichen zu verhindern, wurden neue für
10 die Herstellung von rAAV geeignete Helfer- und Vektorkonstrukte entwickelt, mit denen Wirtszelllinien in Form von Verpackungs- und Produktionszelllinien hergestellt werden. Hierfür wurde die Strategie verfolgt, die rep- und cap-Gene funktionell zu trennen (siehe DE 10044348).

- 15 Die Herstellung von viralen Vektoren, besonders von AAV, erfolgt bevorzugt durch eine Verpackungszelle, eine Vektorzelle oder eine Produktionszelle (Definition s.u.). Diese Zellen können abhängig oder unabhängig von einem Helfervirus sein.
- 20 Eine solche Verpackungs-, Vektor- oder Produktionszelle kann von einem Helfervirus abhängig sein, wenn die AAV-Produktion eine Infektion mit einem Helfervirus erfordert. Eine solche Verpackungs-, Vektor- oder Produktionszelle kann aber auch Helfervirus-unabhängig sein, wenn die AAV-Produktion keine Infektion mit einem Helfervirus erfordert. Eine solche von einem Helfervirus unabhängige Verpackungs-, Vektor- oder Produktionszelle enthält normalerweise Gene,
25 die für die Induktion der AAV-Produktion unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors notwendig sind. Solche Gene können viraler oder zellulärer Herkunft sein.
- 30 Im Rahmen der durchgeführten Versuche zur Entwicklung neuer, für die Herstellung von rAAV geeigneter Helfer- und Vektorkonstrukte, wurde zunächst ver-

sucht, ein cap-Gen Expressionskonstrukt zu verwenden, bei dem das cap-Gen unter der Kontrolle des homologen P40-Promotors steht.

Die Begriffe „natürlicher Promotor“ bzw. „homologer Promotor“ bedeuten, dass die genetische Einheit des Promotors bzw. der regulatorischen Sequenz aus dem gleichen Organismus stammt wie der Rest der Einheit, mit dem sie verglichen wird. Umgekehrt bedeutet ein „heterologer“ oder „nicht natürlicher Promotor“, dass der Promotor von seiner natürlichen kodierenden Sequenz getrennt wurde und operativ mit einer anderen kodierenden Sequenz verbunden wurde.

10

Die Verwendung eines cap-Gen Expressionskonstruktes unter der Kontrolle des P40-Promotors basierte auf der allgemeinen Lehrmeinung, dass für AAV-2 der P40-Promotor (bzw. die entsprechenden Promotoren der anderen AAV-Serotypen) mehr oder minder allein die Expression des cap-Gens steuert (Snyder RO (1999) J. Gene Med. 1:166-75). Allerdings konnte festgestellt werden, dass diese Konstrukte zwar eine starke Expression des Cap-Proteins bewirkten, diese aber nicht mehr regulierbar (d.h. konstitutiv) und somit auch nicht mehr durch Helferviren induzierbar waren (vergleichbar mit einem heterologen Promotor). Als Folge gelang es nicht, ein derartiges cap-Expressionskonstrukt in den Wirtszellen stabil zu integrieren, da die konstitutiv exprimierten Cap-Proteine vermutlich toxisch auf die Zellen wirkten. Zudem wurden bei Verwendung dieses cap-Expressionskonstrukts offenbar hauptsächlich leere Kapside gebildet, da die erzielten Titer an transduzierenden rAAV vergleichsweise niedrig waren.

20

Wie in DE 10044348 beschrieben, lassen sich mit Hilfe einer HeLa-Zell-basierten Verpackungszelllinie, in der die rep- und cap-Gene von AAV funktionell getrennt sind sowie das cap-Gen unter der Kontrolle auch der anderen, eigentlich dem rep-Gen zugeordneten, homologen Promotoren, im Falle von AAV-2 also P5, P19 und P40, steht hohe Ausbeuten an rAAV-Partikeln erzielen, ohne dass dabei jedoch replikationskompetente Wildtyp-AAV (rcAAV)-Partikel gebildet werden. Die Bezeichnungen P5, P19 und P40 werden für alle Serotypen verwendet (Xiao et al.

30

(1999) J. Virol. 73:3994-4003; Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virol. 73:939-47; Chiorini et al. (1999) J. Virol. 73:1309-19; Chiorini et al. (1997) J. Virol. 71:6823-33); für AAV-4 wurde jedoch der P5-Promotor auch als P7-Promotor bezeichnet (Chiorini et al. (1997) J. Virol. 71:6823-33).

5

Unter den Ausdrücken „funktionell unabhängige Einheiten“ oder „funktionell getrennt“ wird verstanden, dass zwei oder mehrere Gene nicht überlappen, wobei der Begriff "Gen" neben der kodierenden Sequenz auch den entsprechenden Promotor umfasst. Konkret heißt dies für das rep- und das cap-Gen, für die im Wild-
10 typ AAV-Genom die kodierende Sequenz des rep-Gens mit der kodierenden Sequenz des cap-Gens und dem cap-Promotor (P40) überlappt, dass beide Gene nicht mehr überlappen. Beispielsweise gelingt dies dadurch, dass beide Teile der gemeinsam verwendeten kodierenden Sequenz und der P40 Promotor dupliziert werden (siehe beispielsweise Fig. 8). Dies kann verschiedene Anordnungen der
15 Gene in einem Genom bedeuten. Zum einen können die Gene an verschiedenen Orten im Genom lokalisiert sein, sei es an verschiedenen Stellen in das Genom integriert oder auf unterschiedlichen Plasmiden lokalisiert oder eine Mischung aus diesen beiden Möglichkeiten. Zum anderen können die Gene auch nebeneinander auf dem selben DNA-Molekül, beispielsweise einem Chromosom oder einem
20 Plasmid, lokalisiert sein, wobei jedoch jedes Gen von seinem eigenen Promotor aus kontrolliert wird. Eine derartige Anordnung ist zum Beispiel dann wahrscheinlich, wenn zwei Gene auf unterschiedlichen DNA-Molekülen gemeinsam transfiziert werden. Diese Moleküle können während der Transfektion Konkata-
25 mer bilden, die dann an einer Stelle in das Genom integrieren, jedoch nach wie vor funktionell unabhängige Einheiten bilden.

In den beschriebenen Zelllinien können die funktionell getrennten rep- und cap-Gene transient, also episomal, transfiziert vorliegen, oder an derselben Stelle beispielsweise als Konkata-
30 mer oder an verschiedenen Stellen in das zelluläre Genom integrieren. Der Vorteil einer solchen Anordnung liegt darin, dass für die Rekonstituierung von rcAAV-Partikeln jeweils mindestens zwei unabhängige

Rekombinationsereignisse notwendig wären, die mit einer Häufigkeit von je 10^{-7} pro Zellteilung, also insgesamt mit 10^{-14} durchaus selten sind. In der Tat konnte in einer rekombinanten Viruspräparation, die 2×10^{10} genomische Partikel enthielt, kein rcAAV nachgewiesen werden.

5

„Die stabile Expression“ eines Proteins in einer Zelle bedeutet, dass die für das Protein kodierende DNA in das Genom der Wirtszelle integriert ist und daher stabil bei der Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben wird. Ferner kann "stabile Expression" bedeuten, dass die DNA episomal vorliegt und durch eine
10 eigenständige Replikation stabil gehalten wird. Dies gelingt beispielsweise durch bekannte, insbesondere virale Replikationssysteme bestehend aus einem Initiator-Protein (z. B. SV40 large T-Antigen, EBNA 1) und einem Replikationsursprung (z. B. SV40 ori, EBV oriP). Obwohl auch Episomen, wie beispielsweise Plasmide, unter bestimmten Bedingungen an die nächste Generation weitergegeben werden können, geht genetisches Material, das episomal in der Wirtszelle vorliegt,
15 schneller verloren als chromosomal integriertes Material. Beispielsweise ist es möglich, die Aufrechterhaltung und Weitergabe des interessierenden genetischen Materials durch den Einbau eines selektierbaren Markers in unmittelbarer Nähe zu dem interessierenden Polynukleotid zu erreichen, wodurch die Wirtszellen, die
20 das Polynukleotid tragen, unter Selektionsdruck gehalten werden können.

Zusammenfassend wurde in DE 10044348 somit die Herstellung von HeLa-Zell-basierten Verpackungszelllinien beschrieben, in der die rep- und cap-Gene von AAV funktionell getrennt sind sowie das cap-Gen unter der Kontrolle der homologen Promotoren, z.B. P5, P19 und P40 steht. Dabei wurden für die AAV-2-
25 Helferkonstrukte die Promotorregionen der Promotoren P5, P19 und P40 durch Mutagenese derart verändert, dass zwar die Promotorfunktion hinsichtlich des Starts der Transkription intakt blieb, durch diese Konstrukte aber kein funktionelles Rep-Protein exprimiert werden konnte. Unter einem funktionellen Rep-
30 Protein wird in diesem Zusammenhang verstanden, dass das Rep-Protein seine ihm zugeschriebenen Funktionen ausüben kann. Im vorliegenden Fall werden

zwar kurze Rep-Fragmente synthetisiert, diese können aber keine wichtige Funktion der Rep-Proteine übernehmen. Andere Mutagenese-Möglichkeiten zur Inaktivierung der Expression des Rep-Proteins, z.B. durch die Inaktivierung des Starts der Transkription, sind dem Fachmann bekannt.

5

So mussten für die Adenovirus-induzierbare Transaktivierung des Promotors P40 die beiden großen Rep-Proteine Rep 68 und Rep 78, sowie die für die AAV Verpackung essentiellen kleinen Rep-Proteine von einer zweiten Quelle (in trans oder in cis) zur Verfügung gestellt werden. Solche Rep-Expressionskonstrukte konnten nun stabil in das Genom der Wirtszellen integriert werden. Diese Konstrukte besitzen den Vorteil, dass in Abwesenheit eines Helfervirus keine toxischen Mengen an Rep-Proteinen exprimiert werden und dennoch eine sehr starke, durch Helferviren induzierbare Rep-Proteinexpression gewährleistet ist.

15 Als „cis“-Element zu einer kodierenden Sequenz wird generell ein operativ mit einem zu transkribierenden Gen verbundener Promotor bezeichnet, der sich aber nicht notwendigerweise in direkter räumlicher Nähe zu dem zu transkribierenden Gen befindet. Der Begriff „operativ verbunden“ bezieht sich auf die Anordnung von zwei oder mehr Komponenten. Da die Komponenten in einer Beziehung zu-
20 einander stehen, wird ihnen erlaubt, ihre Funktion in einer koordinierten Weise auszuüben. Beispielsweise ist eine transkriptionell regulatorische Sequenz oder ein Promotor operativ mit der kodierenden Sequenz verbunden, wenn die transkriptionell regulatorische Sequenz bzw. der Promotor die Transkription der kodierenden Sequenz reguliert bzw. startet. Als „trans“-Element zu einer kodierenden
25 Sequenz bezeichnet man dagegen ein Element, das sich auf einem unterschiedlichen DNA Molekül befindet.

Unter dem Begriff „regulatorische Sequenz“ wird eine genomische Region verstanden, welche die Transkription eines Genes, mit dem es verbunden ist, reguliert. Transkriptionell regulatorische Sequenzen, so wie sie in der vorliegenden
30 Erfindung beschrieben sind, schließen wenigstens einen transkriptionell aktiven

Promotor ein, können aber auch einen oder mehrere Enhancer und/oder Terminatoren der Transkription umfassen.

Die eine Art von bevorzugten Helferkonstrukten für die Herstellung der bevorzugten Wirtszelle zur Verpackung von rAAV enthält Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein, wobei z.B. für AAV-2 unter Rep-Proteinen die Proteine Rep 78, Rep 68, Rep 52 und Rep 40, insbesondere Rep 68, Rep 52 und Rep 40, vor allem Rep 68 und Rep 52 verstanden werden. Die andere Art von bevorzugten Helferkonstrukten enthält Nukleinsäuresequenzen, die für wenigstens eines der bekannten Cap-Proteine kodieren, wobei die Cap-Proteine die Proteine VP1, VP2 und VP3 sind. Die Gene für diese Proteine sowie die ITR-Sequenzen können aus Wildtyp-AAV isoliert werden, die in Form von Klonen allgemein erhältlich sind. So ist beispielsweise der Klon pSM620 bei Samulski et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:2077; der Klon pAV1 bei Laughlen et al. (1983) Gene 23:65 und der Klon sub201 bei Samulski (1987) J. Virol. 61:3096 beschrieben.

In einer gemäß DE 10044348 besonders geeigneten Ausführungsform wird für AAV-2 die Expression des Rep-Proteins durch den natürlichen AAV-Promotor P5 und die Expression des Cap-Proteins durch den natürlichen AAV-Promotor P40, insbesondere durch die natürlichen AAV-Promotoren P19 und P40, vor allem durch die natürlichen AAV-Promotoren P5, P19 und P40 kontrolliert. Entsprechendes gilt für die komplementären Promotoren der anderen AAV-Serotypen.

Vorhergehende Versuche hatten gezeigt, dass die Verwendung heterologer Promotoren für die Rep-Expression nicht zu einer adäquaten Regulation für eine hohe Ausbeute an rAAV führte (Hölscher C. et al. (1994) J. Virol. 68, 7169-7177; Yang Q. et al. (1994) J. Virol. 68, 4847-4856). In einer besonders bevorzugten Ausführungsform von DE 10044348 enthält das Cap-Expressionsplasmid für AAV-2 die AAV-Promotoren P5, P19 und P40, um eine regulierte Expression in Abhängigkeit sowohl von Helfervirus-Infektion oder von Helfervirus-

Genprodukten, als auch von Rep-Protein-Expression zu erlauben, da diese Anordnung am besten den natürlichen lytischen AAV-Lebenszyklus widerspiegelt. Diese Anordnung erwies sich für eine strikt regulierte Cap-Protein-Expression als sehr geeignet. Obwohl bisher in der Literatur zahlreiche Studien publiziert sind, 5 die heterologe Promotoren für die Expression großer Mengen an Cap-Proteinen verwendeten (Gao et al. (1998), supra, Grimm D. (1998) Human Gene Therapy 9:2745-2760), wurden im Rahmen dieser Erfindung die natürlichen Promotoren P5, P19 und P40 für die Cap-Expression verwendet, weil festgestellt wurde, dass der P40-Promotor, wenn er sich nicht mehr in der natürlichen Umgebung der 10 weiteren Promotoren P5 und P19 befindet, als konstitutiver Promotor wirkt. Durch die Verwendung der natürlichen AAV-Regulationssequenz konnte sichergestellt werden, dass Transkriptionsfaktoren, die für die regulierte Expression der cap-Gene benötigt werden, alle Bindestellen in der natürlichen Promotorregion vorfinden, um ihre regulatorischen Funktionen auszuüben.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform von DE 10044348 sind die Expression des Rep-Proteins und des Cap-Proteins in der Wirtszelle voneinander unabhängig reguliert. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil herausgefunden wurde, dass für eine effiziente Verpackung von rAAV in stabilen Zelllinien zunächst eine 20 schwache Cap-Expression erforderlich ist, da andernfalls hohe Cap-Mengen toxisch auf die Zellen wirken bzw. große Mengen an leeren Kapsiden gebildet werden. Zum Zeitpunkt der Verpackung muss hingegen eine starke Cap-Expression erfolgen. Diese beiden Kriterien kann ein konstitutiver, heterologer Promotor nicht gleichzeitig erfüllen. Dies kann zwar durch die Verwendung von induzierbaren, heterologen Promotoren verbessert werden, die exakte zeitliche Regulation 25 sowie die Cap-Expressionsstärke durch derartige Promotoren sind in der Praxis jedoch äußerst schwer umzusetzen. Durch die Verwendung der natürlichen homologen Promotoren ist die Expression von Cap an die Aktivierung durch Helfervirus-Genprodukte und/oder zelluläre Helfergene sowie Rep gekoppelt und somit 30 zeitlich genau wie in der Wildtyp-Situation gesteuert.

Besonders vorteilhaft erfolgt die Termination der Transkription der für die Rep-Proteine und die Cap-Proteine kodierenden Nukleinsäuren durch die natürlichen regulatorischen Sequenzen, insbesondere durch das natürliche AAV-PolyA-Signal. Ähnlich wie bei der Initiation der Transkription erhöht auch die Verwendung homologer Sequenzen zur Termination der Transkription der AAV-cap- und rep-Gene die Menge der durch das AAV-Vektorsystem produzierten rAAV-Partikel.

Geeigneterweise wird als Wirtszelle eine eukaryotische Zelle, bevorzugt eine Säugerzelle, besonders bevorzugt eine Insektenzelle oder menschliche Zelle oder eine Zelllinie, insbesondere HeLa-Zellen, A549 Zellen, K209 Zellen, B50 Zellen, Z211 Zellen (letztere siehe Gao G. et al. (2002) Mol. Ther. 5:644-649) verwendet. Grundsätzlich kann jede Zelle bzw. Zelllinie verwendet werden, die für das Vektorkonstrukt, das Helferkonstrukt und gegebenenfalls für das Helfervirus permissiv, d.h. zugänglich ist. HeLa-Zellen haben sich als besonders vorteilhaft erwiesen, weil der AAV-P5-Promotor in HeLa-Zellen nahezu inaktiv ist und es deshalb möglich ist, in ihr Genom stabil eine Expressionkassette für das AAV-Rep-Protein unter der Kontrolle der natürlichen regulatorischen Elemente zu integrieren, so dass das Rep-Protein in diesen Zellen nicht toxisch wirkt (Clarke et al. (1995) Human Gene Therapy 6, 1229-1341; Tamayose et al. (1996) Human Gene Therapy 7, 507-513; Inoue & Russell (1998) supra; Gao et al. (1998) supra).

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform von DE 10044348 besteht aus einem Helferkonstrukt enthaltend Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein, wobei die Rep-Proteine Rep 68, Rep 52 und/oder Rep 40, nicht aber Rep 78 sind, weil überraschenderweise festgestellt werden konnte, dass neben Rep 52, Rep 40 sowie den drei Cap-Proteinen VP1, VP2 und VP3 die zusätzliche Expression nur des Rep 68 für die Verpackung von AAV-Vektoren ausreichend ist. Der Vorteil dieser Rep 78-defizienten Helferkonstrukte liegt darin, dass das größte Rep-Protein, das für die Verpackungszellen am meisten toxisch ist, überhaupt nicht exprimiert wird. Ferner wurde herausgefunden, dass Rep 78 unter den

Rep-Proteinen die größte hemmende Aktivität auf zelluläre Abläufe wie beispielsweise die Transkription besitzt. Daher kann bei Verwendung dieses Helferkonstrukts aufgrund der Abwesenheit von Rep 78 die Verpackungseffizienz gesteigert werden. Sowohl Rep 68 als auch Rep 78 werden im natürlichen System
5 durch den Promotor P5 exprimiert. Die Verwendung des Rep 78-defizienten Helferkonstrukts ist weiterhin vorteilhaft, weil Rep 68 im Vergleich zu Rep 78 in Adenovirus-infizierten Zellen den stärkeren Transaktivator der AAV-Promotoren P19 und P40 darstellt (Hörer et al. (1995) J. Virol. 69, 5485-5496; Weger et al. (1997) J. Virol. 71, 8437-8447). Daher führt die Verwendung dieses Rep 78-
10 defizienten Helferkonstrukts zu einer gesteigerten Expression der kleineren Rep-Proteine Rep 40 und Rep 52 sowie der Capsidproteine und damit der gewünschten höheren Verpackungseffizienz.

Die Verwendung von viralen Vektoren als virale Transduktionsvektoren in der
15 Gentherapie erfordert im allgemeinen relativ große Mengen an rekombinanten Viruspartikeln. Der Ausdruck „rekombinant“, so wie er im Rahmen dieser Erfindung gebraucht ist, bezieht sich dabei auf eine genetische Einheit, die gegenüber jener Einheit, die natürlicherweise gefunden wird, verändert ist. Somit sind Verfahren von großer wirtschaftlicher Bedeutung, mit denen eine hohe Ausbeute an
20 rekombinanten Viruspartikeln erzielt werden kann. Im Stand der Technik sind einige Verfahren bekannt, z.B. durch Optimierung der rAAV-Produktion mit Hilfe des Herpes Simplex Amplicon-Systems (Feudner et al. (2001) J. Virol. Meth. 96:97-105), durch die Verwendung eines rekombinanten Adenovirus, der rep und cap enthält, als Helfervirus (Zhang et al. (2001) Gene Ther. 8:704-712) oder die
25 Herstellung stabiler AAV-Produktionszelllinien (Clark et al. (1995) Hum. Gene Ther. 6:1329-1341).

Trotz diesen im Stand der Technik bekannten Verfahren ist die Ausbeute an rekombinanten Viruspartikeln häufig immer noch unzureichend. Dies gilt insbesondere für die Fälle, in denen mit Helfergen und/oder -konstrukten stabil transfi-
30 zierte Zellen zur Herstellung von rekombinanten Viruspartikeln verwendet

werden (siehe z.B. Grimm und Kleinschmidt (1999) Hum. Gene Ther. 10:2445-2450, Seite 2447-2448 "Use of producer cell lines").

5 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, Mittel und Verfahren bereitzustellen, die eine erhöhte Ausbeute bei der Herstellung rekombinanter Viruspartikel ermöglichen.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung eines DNA-Methylierungsinhibitors zur Herstellung von viralen, von Parvoviren abgeleiteten
10 Vektoren.

Überraschenderweise hat sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung herausgestellt, dass durch die Zugabe von Methylierungsinhibitoren bei der Herstellung von viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektoren die Verpackungseffizienz
15 deutlich gesteigert werden kann, und damit die Ausbeute an Vektoren wesentlich erhöht werden kann. Dies gilt in besonderem Maße für rAAV und ganz besonders für die Herstellung von rAAV in stabilen AAV-Verpackungs- und/oder Produktionszelllinien. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es beispielsweise möglich, rAAV in stabilen AAV-Verpackungs- und/oder Produktionszelllinien effizient
20 herzustellen. Dadurch kann nun erstmals bei der Herstellung von AAV in großem Maßstab mit stabilen Zelllinien gearbeitet werden, die derart konstruiert sind, dass aufgrund fast ausgeschlossener Rekombinationsereignisse eine besonders hohe Sicherheit besteht. Ein derartiger auf einer Methylierung bzw. deren Hemmung basierender Effekt bei der Herstellung von viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektoren wurde bislang in der Technik nicht beschrieben (siehe z.B.
25 Tamayose et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:507-13; Inoue and Russell (1998) J. Virol. 72:7024-31; Liu et al. (1999) Gene Ther. 6:293-9; Chadeuf et al. (2000) J. Gene Med. 2:260-8; Tessier et al. (2001) J. Virol. 75:375-83).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung eines DNA-Methylierungsinhibitors zur Herstellung von viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektoren.

- 5 Erfindungsgemäß betrifft der Ausdruck „viraler Vektor“ rekombinante Viren. Zur Definition des Begriffes „rekombinant“ siehe oben. Wenn der Begriff auf ein Virus angewendet wird, bedeutet dies, dass das Virus eine oder mehrere Nukleinsäure/n trägt, die durch eine Kombination von Klonierungs-, Restriktions- und/oder Ligationsschritten hergestellt wurde/n und die natürlicherweise nicht in dem Virus
10 vorkommt/vorkommen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind die folgenden Definitionen von allgemeiner Bedeutung:

- 15 Die Begriffe „Gene“ bzw. „Gensequenzen“ beziehen sich auf ein Polynukleotid, das mindestens einen offenen Leserahmen aufweist und das die Fähigkeit besitzt, durch Transkription und Translation ein bestimmtes Protein zu bilden.

- Der Begriff „Protein“ bezieht sich auf ein Polymer von Aminosäuren beliebiger
20 Länge. Der Begriff schließt ebenso Proteine mit ein, die posttranslationale Modifikationsschritte durchlaufen haben, wie beispielsweise Glykosylierung, Acetylierung oder Phosphorylierung.

- Unter den Begriffen „Nukleinsäure“, „DNA“ und „Polynukleotide“ im Sinne der
25 vorliegenden Erfindung sind polymere Formen von Nukleotiden jeder Länge zu verstehen, wobei sich der Begriff nur auf die Primärstruktur des Moleküls bezieht. Daher sind einzel- und doppelsträngige DNA-Moleküle ebenso von diesem Begriff umfasst wie modifizierte Polynukleotide wie beispielsweise methylierte oder geschützte (= capped) Polynukleotide.

Erfindungsgemäß bezieht sich der Ausdruck „von einem Parvovirus abgeleitet“ auf einen Vektor, der Sequenzen von AAV oder einem anderen Parvovirus enthält, wobei diese Sequenzen verändert sein können.

- 5 Erfindungsgemäß bezieht sich der Ausdruck „DNA-Methylierungsinhibitor“ auf jede Substanz, die in der Lage ist, die Methylierung von DNA zu inhibieren.

Die erfindungsgemäße Verwendung des DNA-Methylierungsinhibitors führt zu einer Steigerung der Verpackungseffizienz auf eine Höhe von mindestens 10^6 , vor
10 allem 10^7 , bevorzugt 10^8 , insbesondere 10^9 transduzierenden Partikeln/ml Rohlysat bzw. von mindestens 10^{10} , vor allem 10^{11} , bevorzugt 10^{12} , insbesondere 10^{13} genomischen Partikeln/ml Rohlysat. Dies entspricht 10^5 bis 10^8 genomischen Partikeln pro ausgesäte Zelle. Die Verpackungseffizienz kann indirekt durch die Bestimmung des transduzierenden AAV-Titers mittels geeigneter Zelllinien be-
15 stimmt werden. Diese erfolgte hier konkret durch die Messung der B7.2-positiven Zellen durch Fluoreszenz-Markierung von B7.2 und Zählung durch FACS-Analyse, kann aber bei anderen Transgenen durch einen anderen gängigen Proteinnachweis erfolgen. Eine entsprechende Bestimmung ist in Fig. 1 dargestellt. Der transduzierende Titer ist abhängig vom Detektionsverfahren sowie vom ver-
20 wendeten Zelltyp, so dass bei der Auswahl des Nachweissystems für den entsprechenden Parvovirus bzw. AAV-Serotyp geeignete Zellen zu wählen sind, zum Beispiel HeLa-Zellen für AAV-2. Unabhängig vom Zelltyp ist der genomische Titer. Den genomischen Titer kann man z.B. nach Veldwijk MR et al. (2002) Mol. Ther. 6:272-8 mittels Real-time PCR ermitteln.

- 25 Somit wird durch die erfindungsgemäße Verwendung eine Steigerung der Verpackungseffizienz bei stabil transfizierten Zellen um bis zu 27fach erreicht, wobei auch Werte von mindestens 5fach, vor allem 10fach, bevorzugt 20fach und insbesondere 25fach erfindungsgemäß möglich sind. Diese Zahlenwerte beziehen sich auf einen Vergleich mit Experimenten ohne Verwendung von DNA-
30 Methylierungsinhibitoren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung bezieht sich ein „DNA-Methylierungsinhibitor“ auf eine beliebige niedermolekulare Substanz, ein Nukleosid- (oder Nukleotid-) Analogon, Peptid, Antikörper oder auf
5 Moleküle, Molekülkomplexe oder Gene, die in der Lage sind, die Methylierung von DNA zu inhibieren oder eine methylierte DNA zu demethylieren.

Unter einer „niedermolekularen Substanz“ sind Moleküle, Verbindungen und/oder Zusammensetzungen oder Stoffgemische zu verstehen, insbesondere nieder-
10 molekulare, organische oder anorganische Moleküle oder Verbindungen, vorzugsweise Moleküle oder Verbindungen mit einer relativen Molmasse bis ca. 1.000, insbesondere von ca. 500.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der DNA-Methylierungsinhibitor in der Lage, die Aktivität der DNA-Cytosin-Methyltransferase (DNMT) zu hemmen.
15

Gemäß besonders bevorzugter Ausführungsformen ist der DNA-Methylierungsinhibitor daher ein Nukleosid-Analogon, ein niedermolekularer Inhibitor, ein von
20 DNA abgeleiteter direkter Inhibitor der DNA-Cytosin-Methyltransferase, ein Antisense Oligonukleotid-Inhibitor der DNA-Cytosin-Methyltransferase (siehe Szyf, M., Curr. Drug Targets (2000), 1:101-118) oder ein Herpes-Virus, insbesondere ein HSV oder Herpes-virale Gene.

25 Beispiele für Nukleosid-Analoga sind 5-Aza-Cytidin oder sein Desoxyanalogon 5-Aza-Desoxycytidin oder 5-Fluorocytosin.

Niedermolekulare Inhibitoren sind z.B. S-Adenosyl-Homocystein oder EGX30P (EpiGen X).

Auf DNA basierende direkte Inhibitoren der DNA-Cytosin-Methyltransferase sind z.B. kurze Phosphorthioat-modifizierte Oligonukleotide, welche eine Haarnadelstruktur aufweisen und eine Anzahl von methylierten CGs auf einem Arm der Haarnadelstruktur und nicht-methylierte CGs auf dem anderen Arm tragen, 5 wodurch sie dem hemi-methylierten Substrat von DNA-Cytosin-Methyltransferase ähneln (Szyf, M., supra).

Antisense Oligonukleotidinhibitoren der DNA-Cytosin-Methyltransferase sind z.B. spezifische antisense Oligonukleotide, die sowohl für die DNMT1 mRNA 10 der Maus als auch für die des Menschen untersucht (gescreened) und ausgewählt worden sind (Ramchandani, S. et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:684-689; Fournel, M. et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:24250-24256).

Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist der DNA- 15 Methylierungsinhibitor daher ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 5-Aza-Cytidin, 5-Aza-Desoxycytidin, 5-Fluorocytosin, S-Adenosyl-Homocystein oder EGX30P.

Gemäß einer weiteren ganz besonders bevorzugten Ausführungsform ist der 20 DNA-Methylierungsinhibitor ein Herpes-Virus, bevorzugt ein HSV, insbesondere ein HSV-1 oder HSV-2, bzw. von diesen abgeleitete Viren. Ohne auf einen Mechanismus festgelegt zu sein, scheint die Infektion mit einem Herpes-Virus die zelluläre Genexpression so zu verändern, dass diese zu einer verminderten Methylierung von Genen führt. Andere denkbare Mechanismen sind, dass Herpes- 25 Viren selbst für ein Enzym kodieren, dass die Methylierung von Genen rückgängig macht oder aber dass Herpes-Viren in der Lage sind, unabhängig vom Methylierungsstatus von Genen deren Transkription zu bewirken.

Eine weitere ganz besonders bevorzugte Ausführungsform für einen DNA- 30 Methylierungsinhibitor sind Herpes-virale Gene. Unter dem Begriff "Herpes-virale Gene" werden die Gene von Herpes-Viren verstanden, deren Genprodukte

die Methylierung der DNA inhibieren, aufheben oder die Transkription methylierungsunabhängig machen. So können für die AAV-Herstellung anstelle einer Infektion der Zellen mit einem Herpes-Virus die Herpes-viralen Gene auch transient oder insbesondere stabil in die Zellen transfiziert werden und so analog zu einer
5 Infektion mit einem Herpes-Virus als Methylierungsinhibitor fungieren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung der virale Vektor in einer Zelle hergestellt, die die zur Bildung von Viruspartikeln notwendigen Gene umfasst. Dazu wird auf die obigen
10 Erläuterungen bezüglich Genen, die für die Partikelbildung erforderlich sind, Bezug genommen. Bei den verwendeten Zellen handelt es sich um eukaryotische Zellen, bevorzugt um Säugerzellen, besonders bevorzugt um Insektenzellen oder menschliche Zellen oder Zelllinien, insbesondere um HeLa-Zellen, A549 Zellen, K209 Zellen, B50 Zellen, Z211 Zellen (letztere siehe Gao G. et al. (2002) Mol.
15 Ther. 5:644-649). Grundsätzlich kann jede Zelle bzw. Zelllinie verwendet werden, die für das Vektorkonstrukt, das Helferkonstrukt und gegebenenfalls für das Helfervirus permissiv, d.h. zugänglich ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung der virale Vektor von einer Vektorzelle hergestellt. Der Begriff „Vektorzelle“ bezieht sich auf eine Zelle, welche mindestens ein Vektorkonstrukt, aber kein Helferkonstrukt enthält. Dies bedeutet, dass die Vektorzelle das Ausgangsmaterial für die Herstellung der viralen Vektoren darstellt und dass
20 weitere, für die Partikelbildung wichtige Faktoren wie beispielsweise Helferkonstrukte während des Herstellungsverfahrens hinzugefügt werden.
25

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung der virale Vektor von einer Verpackungszelle hergestellt. Der Begriff „Verpackungszelle“ bezieht sich auf eine Zelle, die mindestens ein Helferkonstrukt, aber kein Vektorkonstrukt enthält. Dies bedeutet, dass die Verpackungszelle das Ausgangsmaterial für die Herstellung der viralen Vektoren dar-
30

stellt und dass weitere, für die Partikelbildung wichtige Faktoren wie beispielsweise Vektorkonstrukte während des Herstellungsverfahrens hinzugefügt werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung der virale Vektor von einer Produktionszelle hergestellt. Der Begriff „Produktionszelle“ bezieht sich auf eine Zelle, welche sowohl mindestens ein Helferkonstrukt, als auch mindestens ein Vektorkonstrukt enthält. Dies bedeutet, dass die Produktionszelle das Ausgangsmaterial für die Herstellung der viralen Vektoren darstellt. Falls Helfergene für die Herstellung der viralen Vektoren erforderlich sind, so werden sie während des Herstellungsverfahrens hinzugefügt.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Verpackungszelle, die Vektorzelle und/oder die Produktionszelle mit Helferkonstrukten stabil transfiziert. Verfahren zur stabilen Transfektion sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Gao et al. (2002) Mol. Ther. 5:644-649).

Gemäß besonders bevorzugter Ausführungsformen liegen in den Verpackungs- und Produktionszelllinien die einzelnen Gene auf dem/den Helferkonstrukten in einer funktionell getrennten Form vor (zur Definition siehe oben).

Daher sind in einer bevorzugten Ausführungsform in dem im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung hergestellten, viralen Vektor nicht mehr als 50 %, bevorzugt nicht mehr als 20 %, besonders bevorzugt nicht mehr als 10 % der vorhandenen Methylierungsstellen methyliert.

Überraschenderweise hat sich in der vorliegenden Erfindung gezeigt, dass bei der Herstellung von viralen Vektoren insbesondere die Methylierung der rep- und cap-Gene oder auch nur derer Promotoren für die geringe Ausbeute an rAAV Partikeln verantwortlich ist. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass eine zusätzliche Transfektion des/der entsprechenden Plasmids/Plasmide enthaltend rep-

und cap-Gene die Produktion von rAAV in 11-20-23 Zellen, die mit Adenoviren infiziert wurden, ebenfalls wieder herstellte. 11-20-23 Zellen wurden durch stabile Transduktion (mit rAAV-(B7.2/GM-CSF)) einer stabilen Verpackungszelllinie (stabile Expression von Rep und Cap) hergestellt. Bei der Verpackungszelllinie
5 handelt es sich um einen Subklon der in WO 02/20748 beschriebenen Zelllinie C97 (siehe Beispiele 8 und 9), die auf HeLa-Zellen basiert. Die Wiederherstellung der rAAV-Produktion durch eine zusätzliche Transfektion des/der entsprechenden Plasmids/Plasmide enthaltend rep- und cap-Gene bedeutet, dass die Methylierung von zellulären Genen bzw. deren Promotoren, die in dem beschriebenen Fall
10 weiterhin bestanden haben muss, offensichtlich keinen negativen Einfluss auf die Herstellung der viralen Vektoren hat. Dieser Versuch ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Parvoviren nicht mit anderen Virusfamilien verglichen werden können, da diese im Gegensatz zu Parvoviren keine rep- bzw. cap-Gene besitzen. Ohne an eine Theorie gebunden zu sein ist es somit wahrscheinlich, dass eine Me-
15 thylierung der an der Herstellung der viralen Vektoren beteiligten rep- und cap-Gene ein Grund für die häufig beobachtete niedrige Ausbeute bei der Herstellung viraler Vektoren ist.

Daher wird in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung durch
20 den Einsatz des DNA-Methylierungsinhibitors die Methylierung der in den rep und cap Genen oder deren Promotoren vorhandenen Methylierungsstellen inhibiert. Die Inhibierung der Methylierung betrifft dabei jede Form der rep- und cap-Gene wie sie in der vorliegenden Erfindung verwendet werden, z.B. in Verpackungszelllinien, in denen die rep- und cap-Gene funktionell getrennt episomal
25 transfiziert oder stabil in das Wirtszellgenom integriert vorliegen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält der virale, von Parvoviren abgeleitete Vektor ein Vektorkonstrukt.

30 Wie oben ausgeführt ist es bei manchen viralen Vektoren wie beispielsweise

- 23 -

AAV erforderlich, dass zur Partikelbildung noch Helfergene vorhanden sind, die aus anderen Viren, sog. Helferviren stammen. In diesem Fall ist es zunächst erfindungsgemäß eingeschlossen, dass diese Helfergene in der Zelle, in der der virale Vektor hergestellt wird, enthalten sind. Diese können beispielsweise stabil integriert oder episomal vorliegen.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird jedoch zur Herstellung des viralen Vektors zusätzlich ein Helfervirus zugesetzt, das in seinem Genom die entsprechenden Helfergene enthält. Beispiele geeigneter Helferviren sind dem Fachmann bekannt und schließen Adenoviren, Herpes Simplex Viren oder Vaccinia-Viren ein.

Grundsätzlich kann der DNA-Methylierungsinhibitor in jedem Stadium der Herstellung der viralen Vektoren bis zur Ernte der viralen Vektoren zugegeben werden. Bevorzugtermaßen erfolgt die Zugabe jedoch mit oder vor der Aktivierung der Virusherstellung, z.B. durch Infektion mit einem Helfervirus im Falle der AAV-Herstellung oder sonstige Aktivierung der Virusherstellung.

Es hat sich herausgestellt, dass ein möglichst früher Einsatz besonders vorteilhaft ist. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird der DNA-Methylierungsinhibitor vor dem Zusetzen des Helfervirus eingesetzt, falls ein Zusetzen eines Helfervirus zur Herstellung viraler Partikel erforderlich ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der virale, von einem Parvovirus abgeleitete Vektor, von einem adeno-assoziierten Virus (AAV), abgeleitet (Pfeifer und Verma (2001) Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2:177-211).

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der virale Vektor von AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 oder AAV-8 abgeleitet.

Beispiele für solche viralen Vektoren sind allgemein bekannt (siehe oben).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden zur Herstellung von rAAV ein Vektorkonstrukt, umfassend das oder die Transgen(e) flankiert von einer, bevorzugt zwei ITR-Regionen, und ein oder mehrere Helferkonstrukt(e) umfassend die rep- und cap-Gene verwendet. Zur genaueren Erläuterung wird auf die obigen Passagen, in denen die Herstellung von AAV-Vektoren beschrieben wird, verwiesen. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird zusätzlich ein Helfervirus, beispielsweise Adenovirus, Herpes-Viren oder Vaccinia Viren, verwendet.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform werden für die Herstellung von viralen, von AAV abgeleiteten Vektoren HeLa-Zellen verwendet. Grundsätzlich kann jedoch jede Zelllinie verwendet werden, die für das Vektorkonstrukt, das Helferkonstrukt und gegebenenfalls für das Helfervirus permissiv, d.h. zugänglich ist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird für die Herstellung von viralen, von AAV abgeleiteten Vektoren eine Verpackungszelllinie verwendet, die Kopien des gesamten AAV-Genoms ohne die flankierenden ITRs und mit rep- und cap-Genen unter Kontrolle ihrer natürlichen viralen Promotoren enthält (siehe oben). Diese Promotoren, P5, P19 und P40, sind in Abwesenheit einer Infektion durch ein Helfervirus inaktiv (Inoue and Russell (1998) J. Virol. 72:7024-7031; Gao et al. (1998) Human Gene Therapy 9:2353-2362).

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die Verpackungszelllinie mit einem Vektorkonstrukt transfiziert.

Danach wird gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform die mit dem Vektorkonstrukt transfizierte Zelllinie mit einem Helfervirus transduziert, was die Expression der AAV-Gene induziert. Solche Zelllinien können für die Herstellung

großer Mengen an AAV, speziell für kommerzielle Anwendungen verwendet werden (siehe oben).

5 Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird an Stelle einer Verpackungszelllinie eine Produktionszelllinie verwendet (zur Definition siehe oben). Dies bedeutet, dass die Transfektion mit einem Vektorkonstrukt nicht erforderlich ist. Hingegen ist die Transduktion mit einem Helfervirus in der Regel erforderlich.

10 Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform sind die rep- und cap-Gene in den Verpackungs- oder Produktionszellen funktionell getrennt (siehe oben und DE 10044348).

15 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die Verpackungs-, Vektor- oder Produktionszelle Helfervirus-unabhängig, d.h. die AAV-Produktion erfordert keine Infektion mit einem Helfervirus. Eine solche von einem Helfervirus unabhängige Verpackungs-, Vektor- oder Produktionszelle enthält normalerweise Gene, die für die Induktion der AAV-Produktion unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors notwendig sind. Solche Gene können viraler oder zellulärer Herkunft
20 sein.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform steht das cap-Gen in den Verpackungs- oder Produktionszellen unter der Kontrolle auch der anderen, eigentlich dem rep-Gen zugeordneten, homologen Promotoren.
25

Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform sind dies im Falle von AAV-2 die Promotoren P5, P19 und P40 (siehe oben und DE 10044348).

30 Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform bedeutet der Ausdruck „funktionell getrennt“ in diesem Zusammenhang, dass das rep-Gen und das cap-Gen auch hinsichtlich ihrer Promotoren nicht überlappen. Beispielsweise ge-

lingt dies dadurch, dass beide Teile der gemeinsam verwendeten kodierenden Sequenz und der P40 Promotor dupliziert werden (siehe beispielsweise Fig. 8). Erfindungsgemäß kann dies verschiedene Anordnungen der Gene in einem Genom bedeuten. Zum einen können die Gene an verschiedenen Orten in der Zelle lokalisiert sein, beispielsweise an verschiedenen Stellen des Genoms integriert vorliegen, auf Plasmiden liegen sowie zum Teil integriert und auf Plasmiden vorliegen. Zum anderen können die Gene auch nebeneinander auf dem selben DNA-Molekül, beispielsweise einem Chromosom oder einem Plasmid, lokalisiert sein, wobei jedoch jedes Gen von seinem eigenen Promotor aus kontrolliert wird. Eine derartige Anordnung ist zum Beispiel dann wahrscheinlich, wenn zwei Gene auf unterschiedlichen DNA-Molekülen gemeinsam transfiziert werden. Diese Moleküle können während der Transfektion Konkatomere bilden, die dann an einer Stelle in das Genom integrieren, jedoch nach wie vor funktionell unabhängige Einheiten bilden.

Gemäß bevorzugten Ausführungsformen liegen in den Verpackungs- oder Produktionszellen die funktionell getrennten rep- und cap-Gene transient, also episodisch, transfiziert vor oder sind an derselben Stelle beispielsweise als Konkatomere oder an verschiedenen Stellen in das zelluläre Genom integriert. Der Vorteil einer solchen Anordnung liegt darin, dass für die Rekonstituierung von replikationskompetenten Wildtyp-AAV (rcAAV)-Partikeln jeweils mindestens zwei unabhängige Rekombinationsereignisse notwendig wären, die mit einer Häufigkeit von je 10^{-7} pro Zellteilung, also insgesamt mit 10^{-14} durchaus selten sind. In der Tat konnte in einer rekombinanten Viruspräparation, die 2×10^{10} genomische Partikel enthielt, kein rcAAV nachgewiesen werden.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind beim cap-Gen die Promotoren P5, P19 und P40 durch Mutagenese derart verändert, dass zwar die Promotorfunktion hinsichtlich des Starts der Transkription intakt ist, durch diese Konstrukte aber kein funktionelles Rep-Protein exprimiert werden kann (siehe oben). Andere Mutagenese-Möglichkeiten zur Inaktivierung der Expression des

- 27 -

Rep-Proteins, z.B. durch die Inaktivierung des Starts der Transkription, sind dem Fachmann bekannt.

Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform werden für die Adenovirus-induzierbare Transaktivierung des Promotors P40 die beiden großen Rep-Proteine Rep 68 und Rep 78 von einer zweiten Quelle (in trans oder in cis, zur Definition siehe oben) zur Verfügung gestellt. Solche Rep-Expressionskonstrukte konnten nun stabil in das Genom der Wirtszellen integriert werden. Diese Konstrukte besitzen den Vorteil, dass in Abwesenheit eines Helfervirus keine toxischen Mengen an Rep-Proteinen exprimiert werden und dennoch eine sehr starke, durch Helferviren induzierbare Rep-Proteinexpression gewährleistet ist.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält eine Art von bevorzugten Helferkonstrukten zur Verpackung von rAAV Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein, wobei z.B. für AAV-2 unter Rep-Proteinen die Proteine Rep 78, Rep 68, Rep 52 und Rep 40, insbesondere Rep 68, Rep 52 und Rep 40, vor allem Rep 68 und Rep 52 verstanden werden. Die andere Art von bevorzugten Helferkonstrukten enthält Nukleinsäuresequenzen, die für wenigstens eines der bekannten Cap-Proteine kodieren, wobei die Cap-Proteine die Proteine VP1, VP2 und VP3 sind. Die Gene für diese Proteine sowie die ITR-Sequenzen können aus Wildtyp-AAV isoliert werden, die in Form von Klonen allgemein erhältlich sind. So ist beispielsweise der Klon pSM620 bei Samulski et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:2077; der Klon pAV1 bei Laughlen et al. (1983) Gene 23:65 und der Klon sub201 bei Samulski (1987) J. Virol. 61:3096 beschrieben.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird für AAV-2 die Expression der Rep-Proteine durch die natürlichen Promotoren P5 und P19 (P5 für Rep 78/Rep 68 und P19 für Rep 52/Rep 40) und die Expression des Cap-Proteins durch den natürlichen AAV-Promotor P40, insbesondere durch die natürlichen AAV-Promotoren P19 und P40, vor allem durch die natürlichen AAV-

Promotoren P5, P19 und P40 kontrolliert. Entsprechendes gilt für die komplementären Promotoren der anderen AAV-Serotypen.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das Cap-Expressionsplasmid für AAV-2 die AAV-Promotoren P5, P19 und P40, um eine regulierte Expression in Abhängigkeit sowohl von Helfervirus-Infektion oder von Helfervirus-Genprodukten, als auch von Rep-Protein-Expression zu erlauben, da diese Anordnung am besten den natürlichen lytischen AAV-Lebenszyklus widerspiegelt. Durch die Verwendung der natürlichen AAV-Regulationssequenzen wird sichergestellt, dass Transkriptionsfaktoren, die für die regulierte Expression der cap-Gene benötigt werden, alle Bindestellen in der natürlichen Promotorregion vorfinden, um ihre regulatorischen Funktionen auszuüben (siehe oben).

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Expression des Rep-Proteins und des Cap-Proteins in der Zelle voneinander unabhängig reguliert. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil herausgefunden wurde, dass für eine effiziente Verpackung von rAAV in stabilen Zelllinien zunächst eine schwache Cap-Expression erforderlich ist, da andernfalls hohe Cap-Mengen toxisch auf die Zellen wirken bzw. große Mengen an leeren Kapsiden gebildet werden. Zum Zeitpunkt der Verpackung muss hingegen eine starke Cap-Expression erfolgen. Diese beiden Kriterien kann ein konstitutiver, heterologer Promotor nicht gleichzeitig erfüllen. Dies kann zwar durch die Verwendung von induzierbaren, heterologen Promotoren verbessert werden, die exakte zeitliche Regulation sowie die Cap-Expressionsstärke durch derartige Promotoren sind in der Praxis jedoch äußerst schwer umzusetzen. Durch die Verwendung der natürlichen homologen Promotoren ist die Expression von Cap an die Aktivierung durch Helfervirus-Genprodukte und/oder zelluläre Helfergene sowie Rep gekoppelt und somit zeitlich genau wie in der Wildtyp-Situation gesteuert.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Termination der Transkription der für die Rep-Proteine und die Cap-Proteine kodierenden Nu-

- 29 -

kleinsäuren durch die natürlichen regulatorischen Sequenzen, insbesondere durch das natürliche AAV-PolyA-Signal. Ähnlich wie bei der Initiation der Transkription verstärkt auch die Verwendung homologer Sequenzen zur Termination der Transkription der AAV cap- und rep-Gene die Menge der durch das AAV-Vektorsystem produzierten rAAV-Partikel.

Geeigneterweise wird als Zelle im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung bei der Herstellung viraler Vektoren im Allgemeinen und von AAV-Vektoren im Besonderen eine eukaryotische Zelle, bevorzugt eine Säugerzelle, besonders bevorzugt eine Insektenzelle oder menschliche Zelle oder Zelllinie, insbesondere HeLa-Zellen, A549 Zellen, K209 Zellen, B50 Zellen, Z211 Zellen (letztere siehe Gao G. et al. (2002) Mol. Ther. 5:644-649) verwendet. Grundsätzlich kann jede Zelle bzw. Zelllinie verwendet werden, die für das Vektorkonstrukt, das Helferkonstrukt und gegebenenfalls für das Helfervirus permissiv, d.h. zugänglich ist. HeLa-Zellen haben sich als besonders vorteilhaft erwiesen, weil der AAV-P5-Promotor in HeLa-Zellen nahezu inaktiv ist und es deshalb möglich ist, in ihr Genom stabil eine Expressionkassette für das AAV-Rep-Protein unter der Kontrolle der natürlichen regulatorischen Elemente zu integrieren, so dass das Rep-Protein in diesen Zellen nicht toxisch wirkt (Clarke et al. (1995) Human Gene Therapy 6, 1229-1341; Tamayose et al. (1996) Human Gene Therapy 7, 507-513; Inoue & Russell (1998) supra; Gao et al. (1998) supra).

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält das Helferkonstrukt Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein, wobei die Rep-Proteine Rep 68, Rep 52 und/oder Rep 40, nicht aber Rep 78 sind. Der Vorteil dieser Rep 78-defizienten Helferkonstrukte liegt darin, dass das größte Rep-Protein, das für die Verpackungszellen am meisten toxisch ist und das die größte hemmende Aktivität auf zelluläre Abläufe wie beispielsweise die Transkription und den Zellzyklus besitzt, überhaupt nicht exprimiert wird. Daher kann bei Verwendung dieses Helferkonstrukts aufgrund der Abwesenheit von Rep 78 die Verpackungseffizienz gesteigert werden. Sowohl Rep 68, als auch Rep 78

- werden im natürlichen System durch den Promotor P5 exprimiert. Die Verwendung des Rep 78-defizienten Helferkonstrukts ist weiterhin vorteilhaft, weil Rep 68 im Vergleich zu Rep 78 in Adenovirus-infizierten Zellen den stärkeren Transaktivator der AAV-Promotoren P19 und P40 darstellt (Hörer et al. (1995) J. Virol. 69, 5485-5496; Weger et al. (1997) J. Virol. 71, 8437-8447). Daher führt die Verwendung dieses Rep 78-defizienten Helferkonstrukts zu einer gesteigerten Expression der kleineren Rep-Proteine Rep 40 und Rep 52 sowie der Capsidproteine und damit zu der gewünschten höheren Verpackungseffizienz.
- 10 Für die Herstellung des Rep 78-defizienten Helferkonstruktes pUCRep68,52,40Cap(RBS)dl37 (vgl. Fig. 9) wurden die AAV Sequenzen von Nukleotid 201 bis Nukleotid 4497 einschließlich der Deletion der Intronsequenz sowie von Nukleotid 658 bis Nukleotid 4460 in das bakterielle Expressionsplasmid pUC19 kloniert, wobei die Bindestellen für das Rep-Protein in der pUC19-
- 15 Sequenz deletiert wurden (vgl. DE 19905501, Beispiel 5). Durch Anwendung dieser Strategie sind zwei rep- sowie wenigstens zwei cap-Gene mit jeweils einer eigenen Poly(A)-Sequenz für die Termination der Transkription hintereinander angeordnet. Ausgehend vom ersten Abschnitt (AAV-Sequenz Nukleotid 201 bis Nukleotid 4497) können die Rep-Proteine Rep 68 und Rep 40 sowie die Cap-
- 20 Proteine VP2 und VP3 exprimiert werden, während ausgehend vom zweiten Abschnitt (AAV-Sequenz Nukleotid 658 bis Nukleotid 4460) die Rep-Proteine Rep 52 und Rep 40 sowie die Cap-Proteine VP1, VP2 und VP3 exprimiert werden. Insgesamt werden damit alle AAV-2 Proteine mit Ausnahme von Rep 78 kodiert.
- 25 Für die Herstellung des ebenfalls Rep 78-defizienten Helferkonstrukts pUCdlRep78Cap(RBS)dl37 (vgl. Fig. 7) wurden die genannten AAV-Sequenzen (nt 201-2310; nt 658-4460 einschließlich der Deletion der Intronsequenz) ebenfalls in das bakterielle Expressionsplasmid pUC19 kloniert (vgl. DE 19905501, Beispiel 5). Dabei wurden wiederum die Bindestellen für das Rep-Protein in der
- 30 pUC19-Sequenz deletiert. Auf diese Weise wurde das rep-Gen partiell dupliziert. Das so entstandene Helferkonstrukt enthält nur eine Poly(A)-Sequenz, so dass alle

mRNA-Transkripte dasselbe 3'-Ende besitzen. Ausgehend vom ersten Abschnitt (AAV-Sequenz Nukleotid 201 bis Nukleotid 2310) können die Rep-Proteine Rep 68 und Rep 40 exprimiert werden, während ausgehend vom zweiten Abschnitt (AAV-Sequenz Nukleotid 658 bis Nukleotid 4460) die Rep-Proteine Rep 52 und Rep 40 sowie die Cap-Proteine VP1, VP2 und VP3 exprimiert werden. Insgesamt werden damit auch durch dieses Vektorkonstrukt alle AAV-2 Proteine mit Ausnahme von Rep 78 kodiert.

Zur Herstellung eines Helferkonstruktes pUCdlRep78dlCap(RBS)dl37 zur Expression der Rep-Proteine Rep 68, Rep 52 und Rep 40 wurden die AAV-Nukleotide 2945 bis 4046 aus dem cap-Gen (Nukleotide 2203 bis 4410) des Helferkonstrukts pUCdlRep78Cap(RBS)dl37 deletiert. Durch diese Deletion können keine funktionellen Cap-Proteine mehr exprimiert werden.

Grundsätzlich wird zur Erläuterung der bevorzugten Ausführungsformen auf die Passagen oben bezug genommen, in denen die Herstellung von AAV allgemein erläutert wird.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung enthalten die Vektorkonstrukte für AAV-Vektoren ein oder mehrere zu AAV heterologe Nukleinsäuren, die von einer, bevorzugt zwei ITR-Sequenzen flankiert werden, wobei die 5'-lokalisierte ITR-Sequenz eine Deletion im Bereich des C-Palindroms aufweist.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Deletion innerhalb der 5'-flankierenden ITR-Sequenz 80 Nukleotide, insbesondere 40 Nukleotide, vor allem 22 Nukleotide im Bereich von Nukleotid 61 bis 82.

Gemäß einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform enthalten diese Vektorkonstrukte die AAV-Sequenzen 1-60/83-191 (Δ C-Arm ITR als linken ITR – siehe DE 10044384) und 4498 bis 4671 (als rechten ITR).

Derartige Vektorkonstrukte enthalten zum Beispiel ein oder mehrere zu AAV heterologe Nukleinsäuren, insbesondere eine Nukleinsäure kodierend für ein Protein ausgewählt aus einem Zytokin, insbesondere IL2, IL4, IL12 und/oder GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) und/oder ein co-stimulierendes Molekül, insbesondere B7, vor allem B7.1 und/oder B7.2. Als heterologe Nukleinsäuresequenz kann gemäß der vorliegenden Erfindung jedoch jede beliebige kodierende wie auch nicht-kodierende Nukleinsäuresequenz verwendet werden. Vorzugsweise wird eine oder mehrere heterologe Nukleinsäuresequenz(en) in ein replikationsdefizientes Vektorkonstrukt durch herkömmliche, dem Fachmann bekannte Klonierungstechniken eingebracht (Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Weitere geeignete Nukleinsäuresequenzen sind kodierende Sequenzen für Chemokine wie Lymphotactin, RANTES, MCP-1 oder Mip-1 α , Cytokine wie IL12, IL7, IL18, IL2, GM-CSF, IL1, IL6, Interferon γ oder IL10, oder Antikörper, Antikörperfragmente oder Einzelstrang-Antikörper, beispielsweise gerichtet gegen ICOS, ferner gegen den ICOS-Rezeptor, CD40, CD40-Liganden, VEGF, IL1, TNF- α , gegen Tumor-Antigene wie beispielsweise Her-2/neu, GD3 oder CA125, gegen virale Antigene oder gegen IgE; des weiteren gegen lösliche Rezeptorformen wie ICOS FC, ICOS-Ligand FC, CD40L FC, TNF- α Rezeptor FC, gegen Apoptose-induzierende Moleküle wie Proteine der BCL-X-Familie, BAX, BAD oder Caspasen, Nekrose-induzierende Peptide wie Perforine, Toxine, beispielsweise abgeleitet von Bakterien, viralen Tumorantigenen wie HPV E6 oder E7, nicht-viralen Tumorantigenen wie B-Lymphom-spezifische Idiotyp-Antikörper, BCRA-1, CA 125, α -Fetoprotein, CEA und p53. Ferner sind kodierende Sequenzen für Blutgerinnungsfaktoren wie z.B. Faktor VIII oder Faktor IX oder Faktoren von anderen bekannten monogenetischen Erberkrankungen geeignet.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Vektorkonstrukt nicht für Polypeptide kodierende Sequenzen, beispielsweise zum Einsatz als

- 33 -

Ribozyme, Antisense-RNAs oder interfering RNAs (RNA_i), die somit von dem Begriff "Transgen" mit umfasst sind.

Demgemäß wird im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung in einer besonders bevorzugten Ausführungsform zur Herstellung von rAAV eine Zelle verwendet, die mindestens eine Kopie eines Helferkonstruktes zur Expression mindestens eines AAV Rep-Proteins und mindestens eines AAV Cap-Proteins und zusätzlich mindestens eine Kopie eines rekombinanten Vektorkonstruktes enthält. Das Vektorkonstrukt ist wiederum dadurch gekennzeichnet, dass es eine fremde DNA trägt, die von mindestens einer ITR-Region flankiert wird.

Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform liegen die für das Rep-Protein und das Cap-Protein kodierenden Nukleinsäuren funktionell getrennt vor und sind operativ mit den natürlichen regulatorischen Sequenzen von AAV verbunden.

Bei der Verwendung eines Herpes-Virus für die Herstellung eines viralen Vektors in mit Helferkonstrukten stabil transfizierten Zelllinien kommt es erfindungsgemäß zu einer Steigerung der Verpackungseffizienz auf eine Höhe von mindestens 10^9 , vor allem 10^{10} , bevorzugt 10^{11} oder 10^{12} , insbesondere 10^{13} genomischen Partikeln/ml Rohlysat, was 10^5 bis 10^8 genomischen Partikeln pro ausgesätere Zelle entspricht. Dies bedeutet eine Steigerung der Verpackungseffizienz um das bis zu 26fache bei stabil transfizierten Zellen.

Unter dem Begriff "Herpes-virale Gene" werden die Gene von Herpes-Viren verstanden, deren Genprodukte die Methylierung der DNA inhibieren, aufheben oder die Transkription methylierungsunabhängig machen (siehe oben).

Gegenstand der Erfindung ist damit auch die Verwendung eines Herpes-Virus oder Herpes-viraler Gene für die Herstellung eines viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektors in mit Helferkonstrukten stabil transfizierten Zelllinien zur Stei-

gerung der Verpackungseffizienz auf mindestens das 5fache, vor allem das 10fache, bevorzugt das 20fache und insbesondere das 25fache im Vergleich zu einer Herstellung unter Verwendung eines Adenovirus ohne Zugabe von DNA-Methylierungsinhibitoren.

5

Obige Ausführungen und Ausführungsformen zu Verpackungszellen, Vektorzellen, Produktionszellen, Helferkonstrukten, Vektorkonstrukten und viralen Vektoren beziehen sich ebenso auf diesen Gegenstand der Erfindung.

- 10 Überraschenderweise konnte im Rahmen dieser Erfindung die beobachtete Hemmung der Verpackungseffizienz bei Verwendung von Verpackungs- und Produktionszelllinien und AdV als Helfervirus auch durch die alleinige Verwendung von Viren der Herpes-Familie wie z.B. HSV-1 als Helfervirus aufgehoben werden. Dies gilt insbesondere für AAV und war aus bisherigen Beschreibungen zur gene-
- 15 relen Verwendung von HSV-1 als Helfervirus für AAV nicht zu erwarten (z.B. Weindler and Heilbronn (1991) J. Virol. 65:2476-83; Conway et al. (1997) J. Virol. 71:8780-9).

- Vorteil dieses Gegenstands der vorliegenden Erfindung ist, dass durch den Einsatz
- 20 von Herpesviren als Helferviren bei der Herstellung von viralen Vektoren die Verpackungseffizienz deutlich gesteigert werden kann. Dies gilt in besonderem Maße für rAAV und ganz besonders für die Herstellung von rAAV in stabilen AAV-Verpackungs- und/oder Produktionszelllinien. Somit wurde gezeigt, dass rAAV in stabilen AAV-Verpackungs- und/oder Produktionszelllinien effizient
- 25 hergestellt werden kann.

- Gemäß dieser Erfindung bezieht sich der Ausdruck Herpesvirus auf ein beliebiges Virus der Herpesvirus-Familie, ob natürlich vorkommend oder rekombinant. Natürlich vorkommende Herpesviren sind z.B. HSV-1, HSV-2, HSV-3 (Varizella
- 30 Zoster), HSV-4 (Epstein-Barr-Virus), HSV-5 (Cytomegalie-Virus), HSV-6, HSV-7 oder HSV-8 oder tierische Herpesviren. Rekombinante Herpesviren sind im

Stand der Technik bekannt. Geeignet sind z.B. onkolytische Herpesviren wie z.B. G207 oder NV1020.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist der virale Vektor von einem Parvovirus, besonders bevorzugt von einem AAV, insbesondere von AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 oder AAV-8 abgeleitet.

Da ein Problem der AAV-Herstellung unter Verwendung der Induktion mit Helferviren darin besteht, die Helferviren anschließend zu inaktivieren, während die hergestellten AAV aktiv bleiben müssen, ist eine bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung die Verwendung von rekombinanten Herpesviren. Diese Ausführungsform ist nicht auf AAV beschränkt, sondern gilt allgemein für alle Verwendungen im Rahmen der vorliegenden Erfindung. In der Literatur sind viele replizierende oder nicht-replizierende Herpesviren bekannt, z.B. G207 oder NV1020. Solche Viren haben den Vorteil, dass in menschlichen klinischen Studien gezeigt wurde, dass solche rekombinanten Herpesviren sicher sind und in Menschen injiziert werden können. Die Verwendung solcher rekombinanter Viren trägt deswegen zur Sicherheit einer AAV-Herstellung bei, da geringe Verunreinigungen von AAV-Produkten für Menschen nicht gefährlich sind.

20

Eine weitere ganz besonders bevorzugte Ausführungsform ist ferner die Verwendung von Herpes-viralen Helfergen für die Herstellung eines viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektors in mit Helferkonstrukten stabil transfizierten Zelllinien zur Steigerung der Verpackungseffizienz. Unter dem Begriff "Herpes-virale Helfergene" werden die Gene von Herpesviren verstanden, deren Genprodukte für die Replikation der AAV notwendig sind bzw. diese fordern (siehe oben). So können anstelle einer Infektion der Zellen für die AAV-Herstellung mit einem Herpes-Virus die Herpes-viralen Helfergene auch transient oder insbesondere stabil in die Zellen transfiziert werden. Entsprechende Helfergene sind oben beschrieben. eingeschlossen. Dies können beispielsweise die sieben Replikationsgene UL5, UL8, UL9, UL29, UL30, UL42 und UL52 sein. UL 5, 8 und 52 bilden

30

den HSV Helikase-Primase Komplex, UL29 kodiert für das Einzelstrang-DNA Bindungsprotein, UL42 für ein Doppelstrang-DNA Bindungsprotein, UL30 kodiert für die HSV DNA Polymerase und UL9 kodiert schließlich für ein Protein, welches an den HSV Replikationsursprung bindet (siehe Weindler FW and Heilbronn R (1991) J. Virol. 65(5):2476-83).

Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung von viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektoren, das dadurch gekennzeichnet ist, dass bei der Herstellung ein DNA-Methylierungsinhibitor verwendet wird.

Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens bezüglich DNA-Methylierungsinhibitoren, Verpackungszellen, Vektorzellen, Produktionszellen, Helferkonstrukten, Vektorkonstrukten und viralen Vektoren entsprechen denjenigen der obigen erfindungsgemäßen Verwendung.

Im Rahmen der erfindungsgemäßen Verwendung oder des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein gering- oder nicht methylierter viraler Vektor hergestellt. Vorzugsweise ist für die Steigerung der Ausbeute an viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektoren vor allem eine geringe bzw. nicht vorhandene Methylierung der rep- und cap-Gene bzw. derer Promotoren notwendig.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält der virale, von Parvoviren abgeleitete Vektor ein Vektorkonstrukt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ebenfalls ein Vektorkonstrukt, das dadurch gekennzeichnet ist, dass nicht mehr als 50 %, bevorzugt nicht mehr als 20 %, besonders bevorzugt nicht mehr als 10 % der vorhandenen Methylierungstellen methyliert sind.

Ein Vorteil solcher gering oder nicht-methylierten Vektorkonstrukte liegt darin, dass diese bei der Transduktion in die Empfängerzellen, besonders Säugerzellen,

ganz besonders humane Zellen, aufgrund des niedrigen Methylierungsgrades stärker exprimiert werden als vergleichbare methylierte Gene.

Somit werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung Verfahren und Verwendungen bereitgestellt, welche eine Erhöhung der Ausbeute bei der Herstellung viraler Vektoren ermöglichen.

Die Erfindung wird im folgenden durch Beispiele und Figuren erläutert.

10

Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1 zeigt die Titer (transduzierende Partikel (tp) pro ml) eines transduzierenden rAAV-(B7.2/GM-CSF) (auf AAV-2 basiert) drei Tage nach HSV-1 Infektion oder nach AdV Infektion (jeweils MOI 10). AdV wurde entweder allein oder in Kombination mit jeweils 50 mM Na-Butyrat (But), 3 μ M Trichostatin A (TSA) oder 3 μ M 5-Azacytidin (Aza) (Sigma, Deisenhofen) gegeben. Standard bedeutet transiente Co-Transfektion von HeLa-Zellen mit pAAV-(B7.2/GM-CSF) sowie des AAV-2 rep/cap-Helferplasmids und Infektion mit Adenovirus (AdV) (MOI 10), Ernte 3 Tage nach Infektion.

25

Fig. 2 zeigt eine Western-Blot Analyse der AAV-2 Rep und Cap Expression in Produktionszellen, jeweils nach AdV oder HSV-1 Infektion (jeweils MOI 10).

Fig. 3 zeigt eine schematische Darstellung des Vektorkonstrukts pAAV-(B7.2/GMCSF).

Fig. 4 zeigt die schematische Darstellung des Helferkonstrukts pUCp5Repdl37, das für Rep40, Rep52, Rep68 und Rep78 kodiert.

30

- 38 -

Fig. 5 zeigt die schematische Darstellung des Helferkonstrukts pUCp5p19p40Capdl37, das für VP1, für VP2 und für VP3 kodiert.

Fig. 6 zeigt die schematische Darstellung des Helferkonstrukts pUCdlRep78dlCap(RBS)dl37, das für Rep40, Rep52 und Rep68 kodiert.

Fig. 7 zeigt die schematische Darstellung des Helferkonstrukts pUCdlRep78Cap(RBS)dl37, das für Rep40, Rep52 und Rep68 sowie für VP1, für VP2 und für VP3 kodiert.

Fig. 8 zeigt eine schematische Darstellung zweier Helferkonstrukte im Vergleich zu Wildtyp-AAV. Die natürlichen AAV-Promotoren P5, P19 und P40 sind ebenso gezeigt wie das „Major Intron“ des AAV-Genoms („I“) und das natürliche Poly(A)-Signal des AAV-Genoms („pA“). Weiterhin sind die kodierenden Sequenzen des Rep- und des Cap-Gens von AAV gezeigt.

Fig. 9 zeigt schematisch ein Rep 78-defiziente Helferplasmid mit der Bezeichnung pUCRep68,52,40Cap(RBS)dl37, das für Rep40, Rep52 und Rep68 sowie für VP1, für VP2 und für VP3 kodiert.

Beispiele

Beispiel 1: AAV-Produktion in Produktionszellen mit verschiedenen Inhibitoren

A. Zellkultur

Revitalisierung von HeLa-t-Zellen und Derivaten

Ein Kryoröhrchen HeLa-t-Zellen oder von HeLa-t abgeleiteten AAV-Verpackungs- oder Produktionszellen (5×10^6 bis 1×10^7 Zellen pro Kryoröhrchen pro ml) wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden sofort zu 10 ml DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium) gegeben und 5

Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und die Zellen erneut 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 bis 30 ml DMEM/10% FKS (fötales Kälberserum) resuspendiert und bei 37°C, 5% CO₂ kultiviert.

5

Zellkultur und Transfektionen

HeLa-t-Zellen und die abgeleiteten Verpackungs- und Produktionszellen wurden als adhärenzte Kulturen in DMEM/10% FKS bei 37°C, 5% CO₂ gehalten. Zur Selektion stabiler Verpackungszellklone wurde Neomycin zu einer Endkonzentration von 800 µg/ml zugegeben.

10

Die Transfektionen wurden mit Hilfe herkömmlicher Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethoden und Endotoxin-freier Plasmid-DNA durchgeführt, die unter Verwendung von Kits der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) präpariert worden war.

15

B. Vektoren

Plasmidkonstruktion

Die Plasmide (Vektorplasmide und Helferplasmide), die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet wurden, wurden unter Anwendung von Standardklonierungstechniken, wie sie bei Sambrook et al., (1989), supra, nachzulesen sind, hergestellt.

20

Das Plasmid pUCp5Rep (Fig. 8) wurde durch Deletion eines DNA-Fragments hergestellt, das die Nukleotide 2300-4170 des AAV-Genoms enthielt. (Ruffing et al. (1994) J. Gen. Virol. 75, 3385-3392 (Gene Bank Accession No. AF 043303). pUCp5Repdl37 wurde durch Deletion der AAV-Basen 4461 – 4497 aus pUCp5Rep gewonnen. Das Plasmid pUCp5p19p40Cap (Fig. 8) wurde durch Deletion des DNA-Abschnitts zwischen den Nukleotiden 350 bis 650 und 1045 bis 1700 des AAV Genoms erhalten. pUCp5p19p40Capdl37 wurde durch Deletion der AAV-Basen 4461 – 4497 aus pUCp5p19p40Cap gewonnen.

25

30

Die Vektorkonstrukte für pAAV-(B7.2/GM-CSF) wurden mit Hilfe des pCI-Plasmids der Firma Promega (Deutschland) konstruiert und anschließend in ein pUC19-basiertes Plasmid, welches die ITR-Sequenzen aufwies, überführt (vgl. WO 00/47757).

5

Das Rep-Helferkonstrukt pUCdlRep78dlCapdl37 wurde durch Deletion der Nukleotide 3046 bis 4149 aus dem Helferkonstrukt pUCdlRep78Cap(RBS)dl37; Klonierung siehe WO 00/47757 S.26 Z.14 bis S.29 Z.5 als pUC"ΔRep78Cap"(RBS) Δ37) unter Verwendung des Restriktionsenzymys
10 ApaI hergestellt. Die entsprechenden Plasmidkarten sind in den Abbildungen 3 bis 7 dargestellt.

Das Helferplasmid pUCp5Repdl37 führt zur Expression aller vier AAV-Rep-Proteine Rep 78, Rep 68, Rep 52 und Rep 40. Das Helferplasmid
15 pUCdlRep78dlCap(RBS)dl37 führt zur Expression von Rep 68, Rep 52 und Rep 40. Das Helferplasmid pUCp5p19p40Capdl37 führt zur Expression aller drei AAV-Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3. Das Vektorplasmid pAAV-(B7.2/GM-CSF) führt zur Verpackung des rAAV-(B7.2/GM-CSF)-Genoms in
20 AAV-Partikel und zur Expression von B7.2 und GM-CSF in den mit diesen AAV-Partikeln infizierten Zellen.

C. Herstellung von Zelllinien

Herstellung von stabilen Verpackungszelllinien für rAAV

HeLa-t-Zellen wurden mit den Plasmiden pUCp5Repdl37,
25 pUCp5p19p40Capdl37 und pCI-neo (Promega) im Verhältnis von 10:10:1 oder mit pUCdlRep78dlCapdl37, pUCp5p19p40Capdl37 und pCI-neo im Verhältnis von 10:10:1 kotransfiziert. Stabil transfizierte Zellklone wurden zunächst auf Neomycinresistenz selektiert. Anschließend wurde auf rAAV-Verpackungseffizienz selektiert, indem die Klone jeweils mit einem Vektorplasmid (z.B. pAAV-(B7.2/GM-CSF, siehe Fig.3) transient transfiziert und mit
30 Adenovirus überinfiziert wurden. Die hergestellten Lysate wurden bezüglich

des transduzierenden rAAV-Titers analysiert. Die Zellklone, die zu den höchsten rAAV-Titern führten und auch in hoher Passagenzahl noch gleichbleibende rAAV-Titer ergaben, wurden expandiert.

5 Herstellung einer stabilen Produktionszelllinie für rAAV

Zur Herstellung einer stabilen Produktionszelllinie für rAAV-(B7.2/GM-CSF) wurde die oben beschriebene C97-Zelllinie stabil mit dem rekombinanten Virus rAAV-(B7.2/GM-CSF) infiziert. Die Selektion positiver Zellklone erfolgte in rAAV-Produktionstests durch Infektion mit Adenovirus, Analyse der entsprechenden Lysate bezüglich des transduzierenden rAAV-Titers und Expansion der Klone, die zu den höchsten rAAV-Titern führten und auch in hoher Passagenzahl noch gleichbleibende rAAV-Titer ergaben.

D. Verpackung/Herstellung von rAAV

15 Herstellung von rAAV mit Hilfe von Verpackungszelllinien

Die Herstellung von rAAV mit Hilfe der Verpackungszelllinien (z.B. $2,5 \times 10^5$ ausgesäte Zellen in einer Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser, ausgesät 1 Tag vor der Transfektion) erfolgte zu Beginn durch transiente Transfektion eines Vektorplasmids (z.B. pAAV-(B7.2/GM-CSF)) gefolgt von einer Infektion mit Adenovirus („multiplicity of infection“ MOI 10) 24 Stunden nach der genannten Transfektion. Nach der beobachteten Abschaltung der in den Verpackungszellen integrierten rep- und cap-Gene wurde die Herstellung dahingehend modifiziert, dass zusammen mit der Adenovirus-Infektion die Zugabe von 5-Azacytidin (Sigma, Deisenhofen) bis zu einer Endkonzentration von 3 μM zu den Zellen erfolgte oder dass an Stelle der Adenovirus-Infektion nur mit HSV-1 (MOI 10) infiziert wurde.

Nach weiteren 72 Stunden wurden die Lysate durch Frier-Tau-Lyse hergestellt und von den Zelltrümmern befreit. Adenovirus oder HSV-1 wurden bei 56°C hitzeinaktiviert.

Herstellung von rAAV mit Hilfe von Produktionszelllinien

Die Herstellung von rAAV-(B7.2/GM-CSF) mit Hilfe der Produktionszelllinien (z.B. 1×10^6 ausgesäte Zellen in einer Zellkulturschale mit 6 cm Durchmesser, ausgesät 1 Tag vor der Infektion) erfolgte zu Beginn durch Infektion mit Adenovirus („multiplicity of infection“ MOI 10). Nach der beobachteten Abschaltung der in den Produktionszelllinien integrierten rep- und cap-Gene wurde die Herstellung dahingehend modifiziert, dass zusammen mit der Adenovirus-Infektion 5-Aza-Cytidin (Sigma, Deisenhofen) bis zu einer Endkonzentration von $3 \mu\text{M}$ zu den Zellen erfolgte oder dass an Stelle der Adenovirus-Infektion mit HSV-1 (MOI 10) infiziert wurde. Nach 72 Stunden wurden die Lysate durch Frier-Tau-Lyse hergestellt und von den Zelltrümmern befreit. Adenovirus oder HSV-1 wurden bei 56°C hitzeinaktiviert. Bei der Herstellung von rAAV mit Hilfe von Produktionszelllinien entfällt der Transfektionschnitt, so dass man nicht mehr auf eine adhärente Kultivierung der Zellen angewiesen ist.

Beispiel 2: AAV-Produktion in Produktionszellen mit verschiedenen Inhibitoren

Um festzustellen, ob es ein auf Histon-Deacetylierung oder DNA-Methylierung beruhenden Effekt gibt, wurden die Produktionszellen mit dem eher unspezifischen Inhibitor der Histon-Deacetylierung Na-Butyrat (But) (Sigma, Deisenhofen), mit dem spezifischen Inhibitor der Histon-Deacetylierung Trichostatin A (TSA) (Sigma, Deisenhofen) oder mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Aza-Cytidin (Aza) (Sigma, Deisenhofen) behandelt (siehe Fig. 1). Alle behandelten Zellen wurden auch mit Adenovirus (AdV) infiziert. In mehreren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Infektion der Produktionszellen mit Adenoviren als Helferviren eine vergleichsweise geringe Ausbeute an transduzierenden rAAV Partikeln (tP) erbrachte, wohingegen die Produktion von rAAV mittels transienter Transfektion von Helfer- und Vektorkonstrukt und Infektion mit Adenovirus eine sehr gute Effizienz aufwies.

Diese AAV-Verpackungseffizienz konnte entweder durch Verwendung von HSV als Helfervirus oder durch AdV in Kombination mit Aza wiederhergestellt werden; dagegen führten But und TSA zu keiner Steigerung der AAV-Verpackungseffizienz.

5

Anscheinend gibt es eine durch DNA-Methylierung verursachte Unterdrückung der AAV-Gene, welche durch HSV oder durch AdV in Verbindung mit einem DNA-Methylierungsinhibitor aber nicht durch AdV alleine überwunden werden kann.

10

Beispiel 3: Rep und Cap Expressionsspiegel von Produktionszellen nach Infektion mit HSV oder AdV

Ein Vergleich der Expression von AAV-2 Rep und Cap von den integrierten rep und cap Genen in Produktionszellen nach HSV-1 oder AdV Infektion zeigte deutlich, dass AdV im Gegensatz zu HSV-1 nicht zu einer signifikanten Expression von Rep und Cap führte (siehe Fig. 2). Dies zeigt wieder die Unterdrückung der integrierten AAV-2 Gene.

20 In diesem Versuch wurden pro Ansatz 2×10^6 Zellen mit HSV-1 bzw. Adenovirus (jeweils MOI 10) infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Lysate hergestellt, 1:1 mit 2xProteinpuffer (100 mM Tris-Cl pH 8,0, 2 mM EDTA, 4% SDS, 20% Glycerol, 10% Beta-Mercaptoethanol, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Von jedem Ansatz wurden gleiche Mengen im SDS-
25 Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Verfahren (SDS-PAGE) aufgetrennt. Der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte im Semidry-Verfahren. Der Nachweis erfolgte mit dem Rep-spezifischen Antikörper 303.9 und dem Cap-spezifischen Antikörper B1 (Wistuba et al. (1997) J. Virol. 71:1341-1353).

30

Patentansprüche

1. Verwendung eines DNA-Methylierungsinhibitors zur Herstellung von viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektoren.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch charakterisiert, dass der DNA-Methylierungsinhibitor ein Nukleosid-Analogon, ein niedermolekularer Inhibitor, ein von DNA abgeleiteter direkter Inhibitor der DNA-Cytosin-Methyltransferase, ein Antisense Oligonukleotid-Inhibitor der DNA-Cytosin-Methyltransferase oder ein Herpes-Virus, insbesondere ein HSV oder Herpesvirale Gene ist.
3. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der DNA-Methylierungsinhibitor aus der Gruppe bestehend aus 5-Aza-Cytidin, 5-Aza-Desoxycytidin, 5-Fluorocytosin, S-Adenosyl-Homocystein oder EGX30P ausgewählt ist.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass der virale Vektor in einer Zelle hergestellt wird, die die zur Bildung von Viruspartikeln notwendigen Gene umfasst.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der virale Vektor von einer Vektorzelle hergestellt wird.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der virale Vektor von einer Verpackungszelle oder einer Produktionszelle hergestellt wird.
7. Verwendung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Verpackungszelle oder die Produktionszelle mit Helferkonstrukten stabil transfiziert sind.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass in dem hergestellten viralen Vektor nicht mehr als 50 %, bevorzugt nicht mehr

- 45 -

als 20 %, besonders bevorzugt nicht mehr als 10 % der vorhandenen Methylierungsstellen methyliert sind.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass durch den Einsatz des DNA-Methylierungsinhibitors die Methylierung der in den rep und cap Genen oder deren Promotoren vorhandenen Methylierungsstellen inhibiert wird.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass zur Herstellung des viralen Vektors zusätzlich ein Helfervirus zugesetzt wird.
11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der DNA-Methylierungsinhibitor vor dem Zusetzen des Helfervirus eingesetzt wird.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der virale Vektor von einem Dependovirus, besonders bevorzugt von einem adeno-assoziierten Virus (AAV) abgeleitet ist.
13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der virale Vektor von AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 oder AAV-8 abgeleitet ist.
14. Verwendung eines Herpes-Virus bei der Herstellung eines viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektors in mit Helferkonstrukten stabil transfizierten Zelllinien zur Steigerung der Verpackungseffizienz auf mindestens das 5fache, vor allem das 10fache, bevorzugt das 20fache und insbesondere das 25fache im Vergleich zu einer Herstellung unter Verwendung eines Adenovirus ohne Zugabe von DNA-Methylierungsinhibitoren.
15. Verwendung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass zur Herstellung des viralen Vektors eine Zelle wie in den Ansprüchen 4 bis 7 definiert verwendet wird.

- 46 -

16. Verwendung nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet dass der virale Vektor von einem Parvovirus, besonders bevorzugt von einem AAV, insbesondere von AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7 oder AAV-8 abgeleitet ist.
- 5 17. Verwendung nach den Ansprüchen 12, 13 und 16, dadurch gekennzeichnet, dass zur Herstellung von rAAV eine Zelle verwendet wird, die mindestens eine Kopie eines Helferkonstruktes zur Expression mindestens eines AAV Rep-Proteins und mindestens eines AAV Cap-Proteins und zusätzlich mindestens eine Kopie eines rekombinanten AAV-Plasmids, das fremde DNA, die von
10 ITR-Regionen begrenzt wird trägt, enthält.
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die für das Rep-Protein und das Cap-Protein kodierenden Nukleinsäuren funktionell getrennt vorliegen und operativ mit den natürlichen regulatorischen Sequenzen von AAV verbunden sind.
- 15 19. Verfahren zur Herstellung von viralen, von Parvoviren abgeleiteten Vektoren, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Herstellung ein DNA-Methylierungsinhibitor verwendet wird.
20. Verfahren nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Verwendung des DNA-Methylierungsinhibitors wie in den Ansprüchen 3 bis 13, 17 und 18
20 definiert ist.
21. Von Parvoviren abgeleitetes Vektorkonstrukt, dadurch gekennzeichnet, dass nicht mehr als 50 %, bevorzugt nicht mehr als 20 %, besonders bevorzugt nicht mehr als 10 % der vorhandenen Methylierungsstellen methyliert sind.

Fig. 1

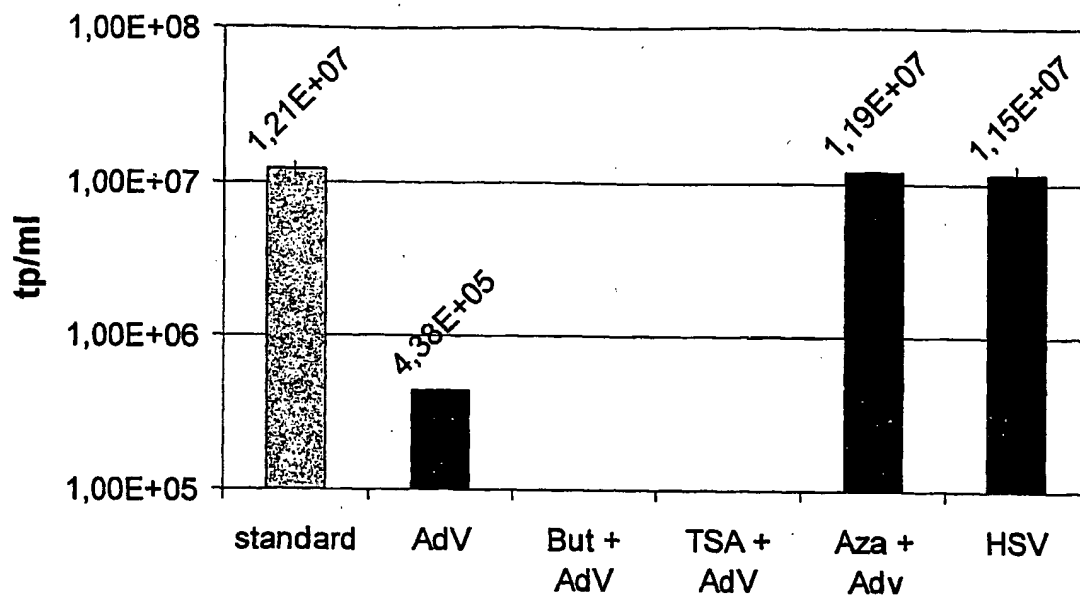


Fig. 2

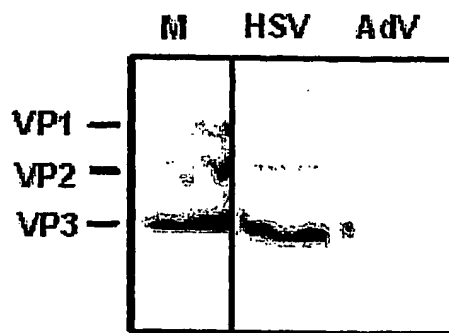
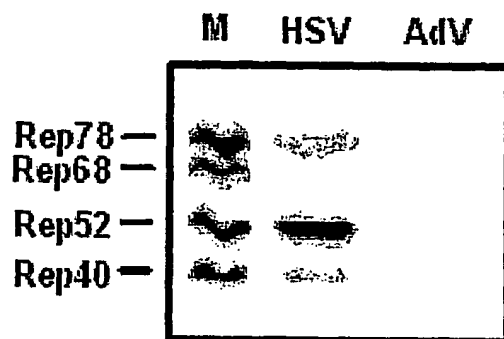


Fig. 3

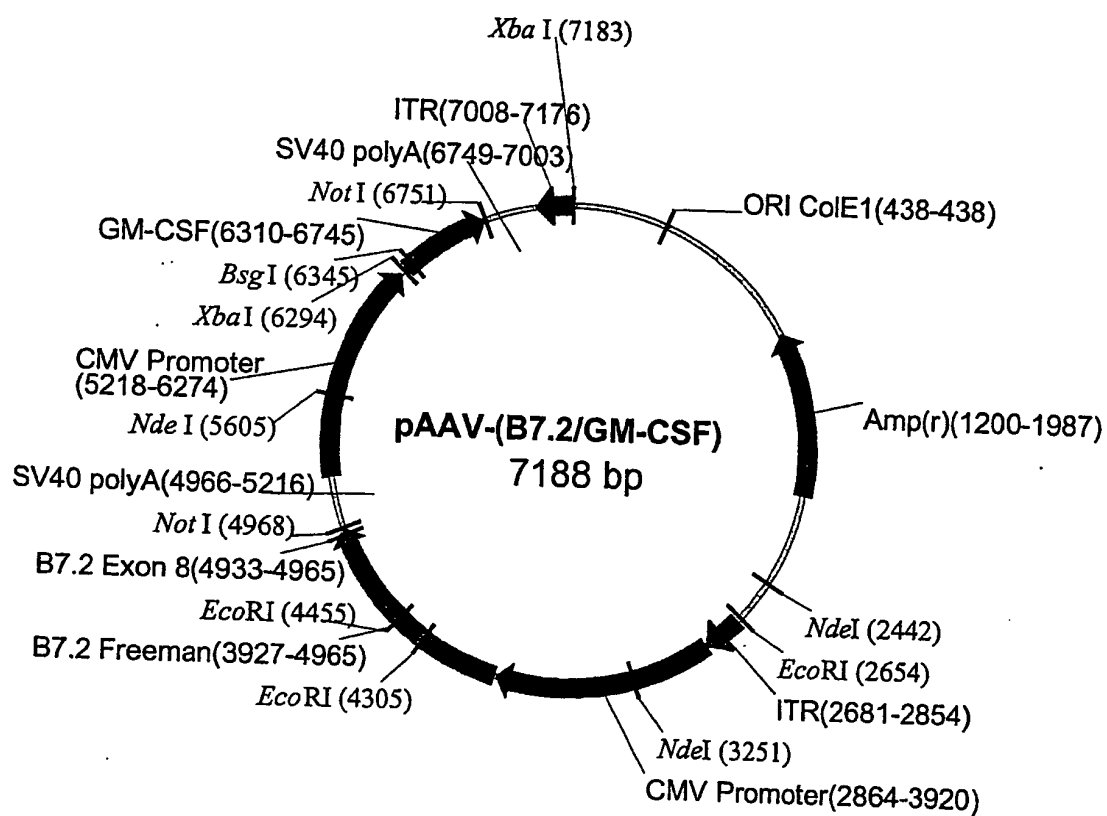


Fig. 4

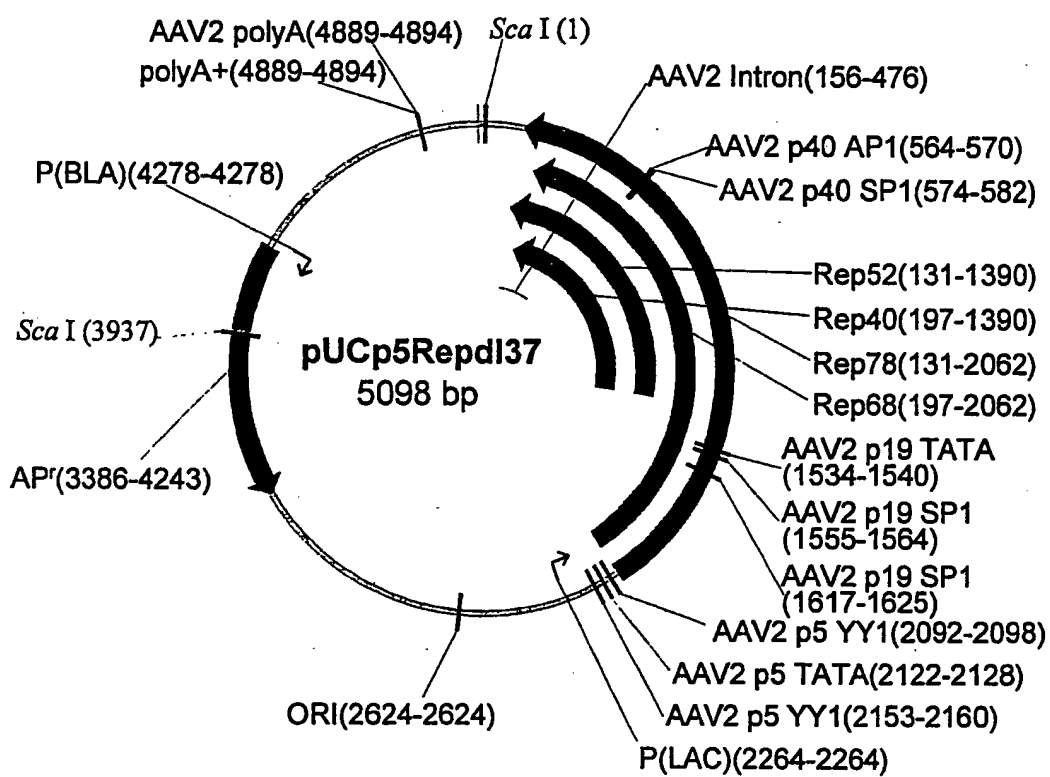


Fig. 5

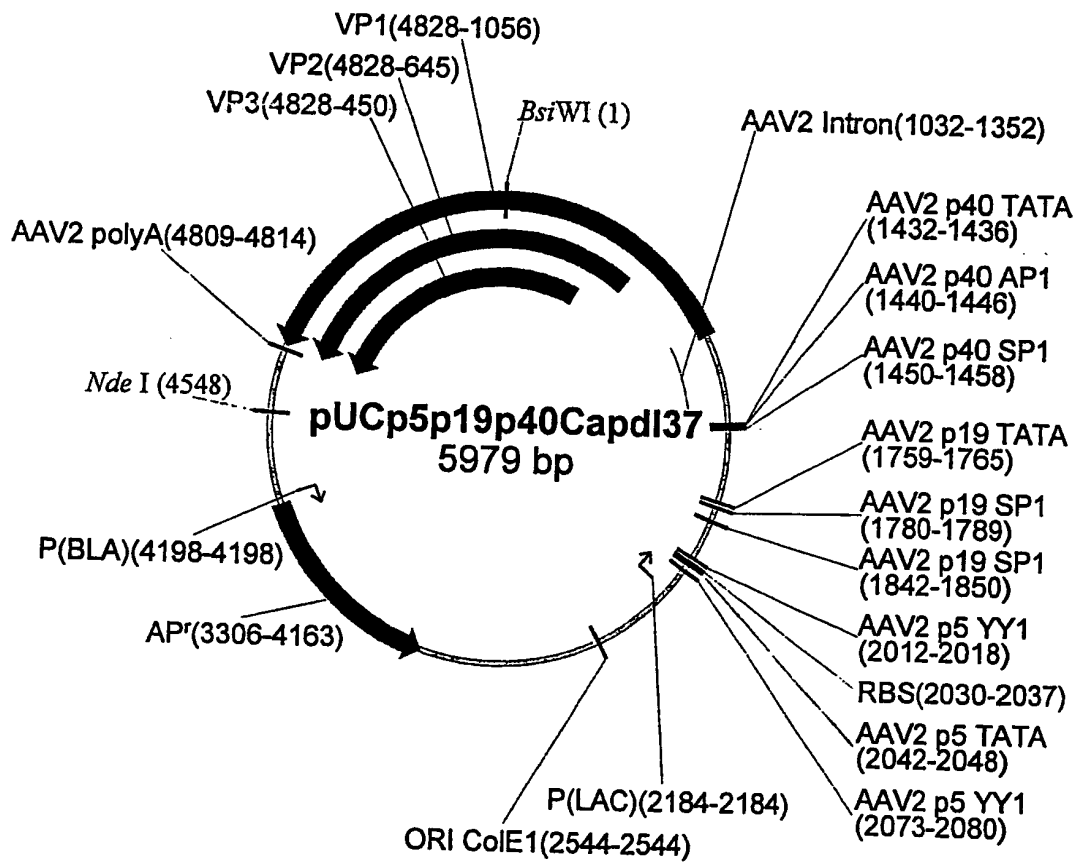


Fig. 6

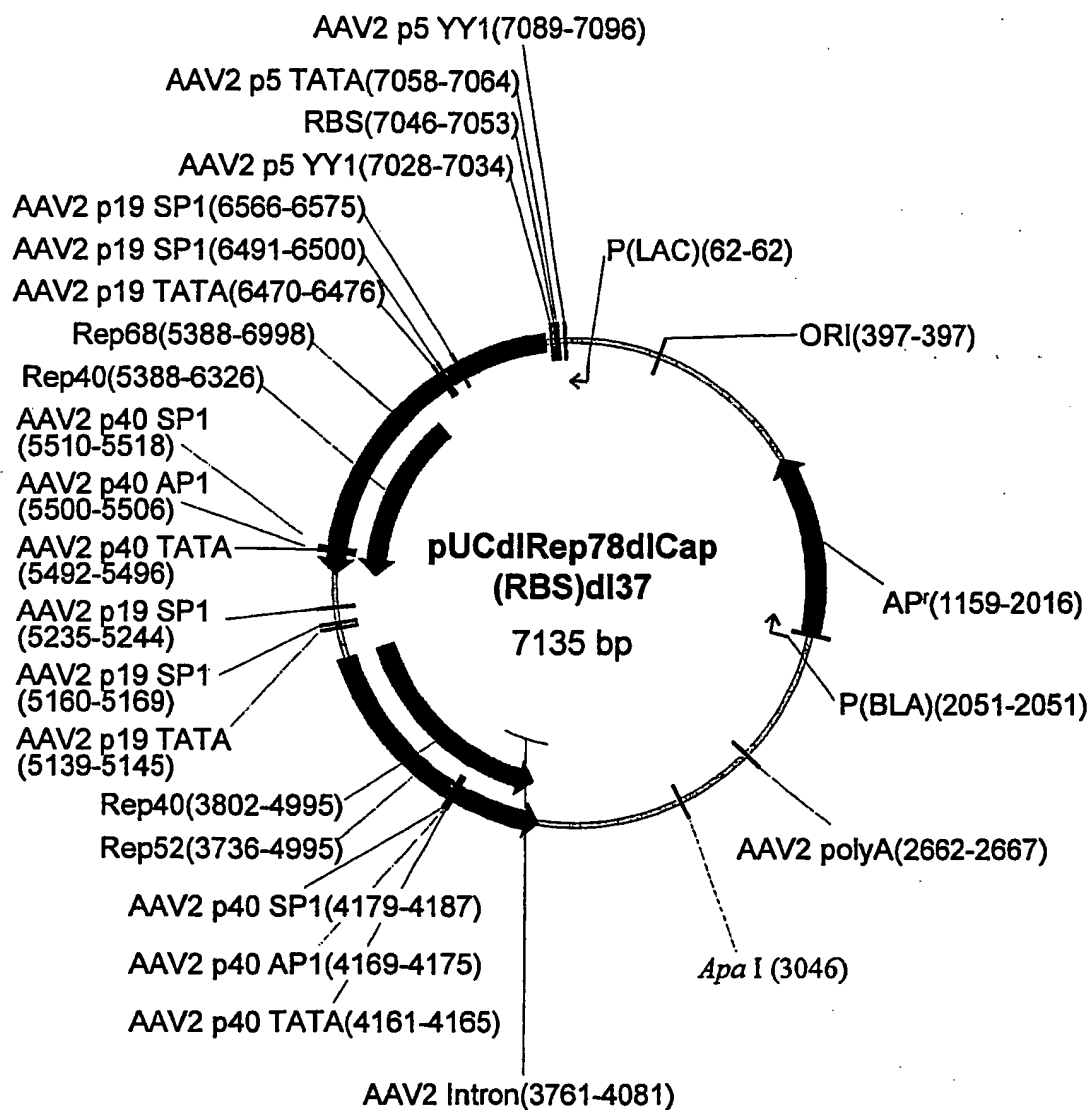


Fig. 7

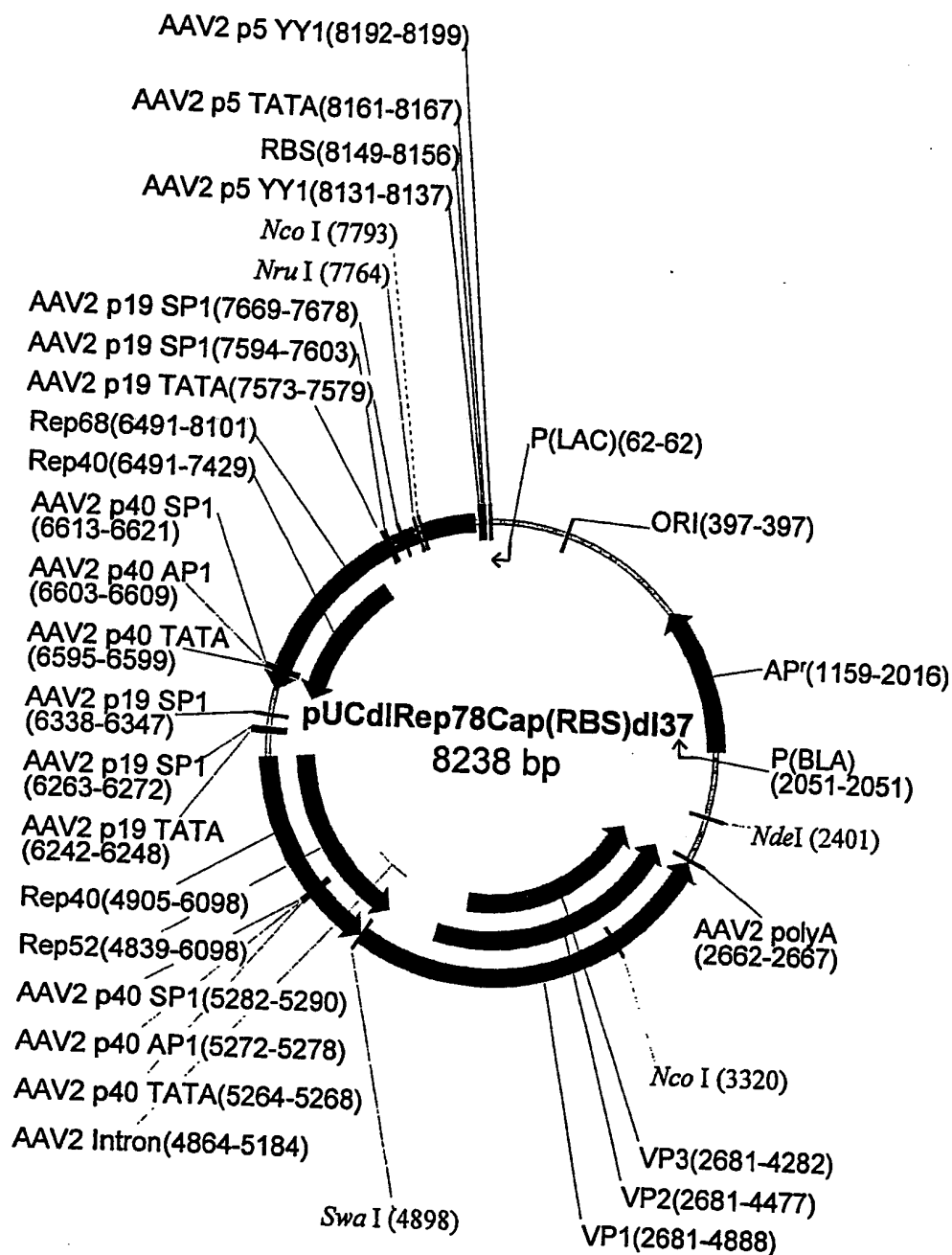
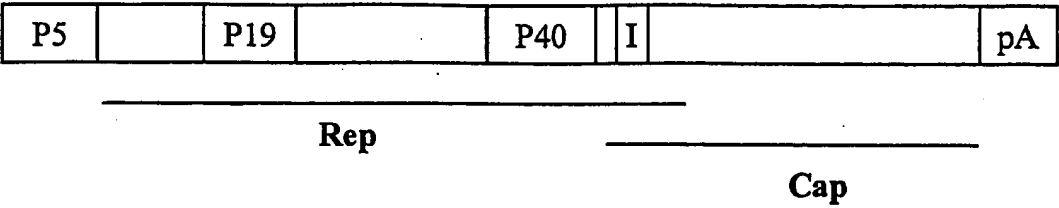
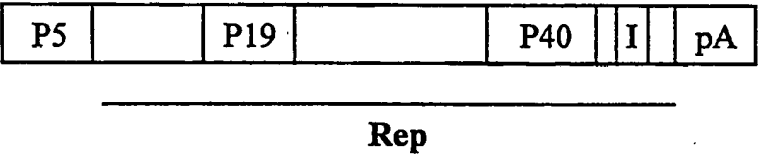


Fig. 8

Wildtyp AAV (ohne ITR-Sequenzen)



Helferkonstrukt P5 Rep



Helferkonstrukt P5P19P40 Cap

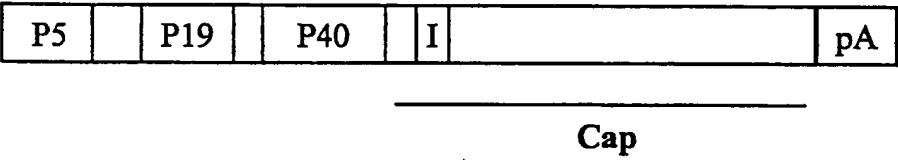
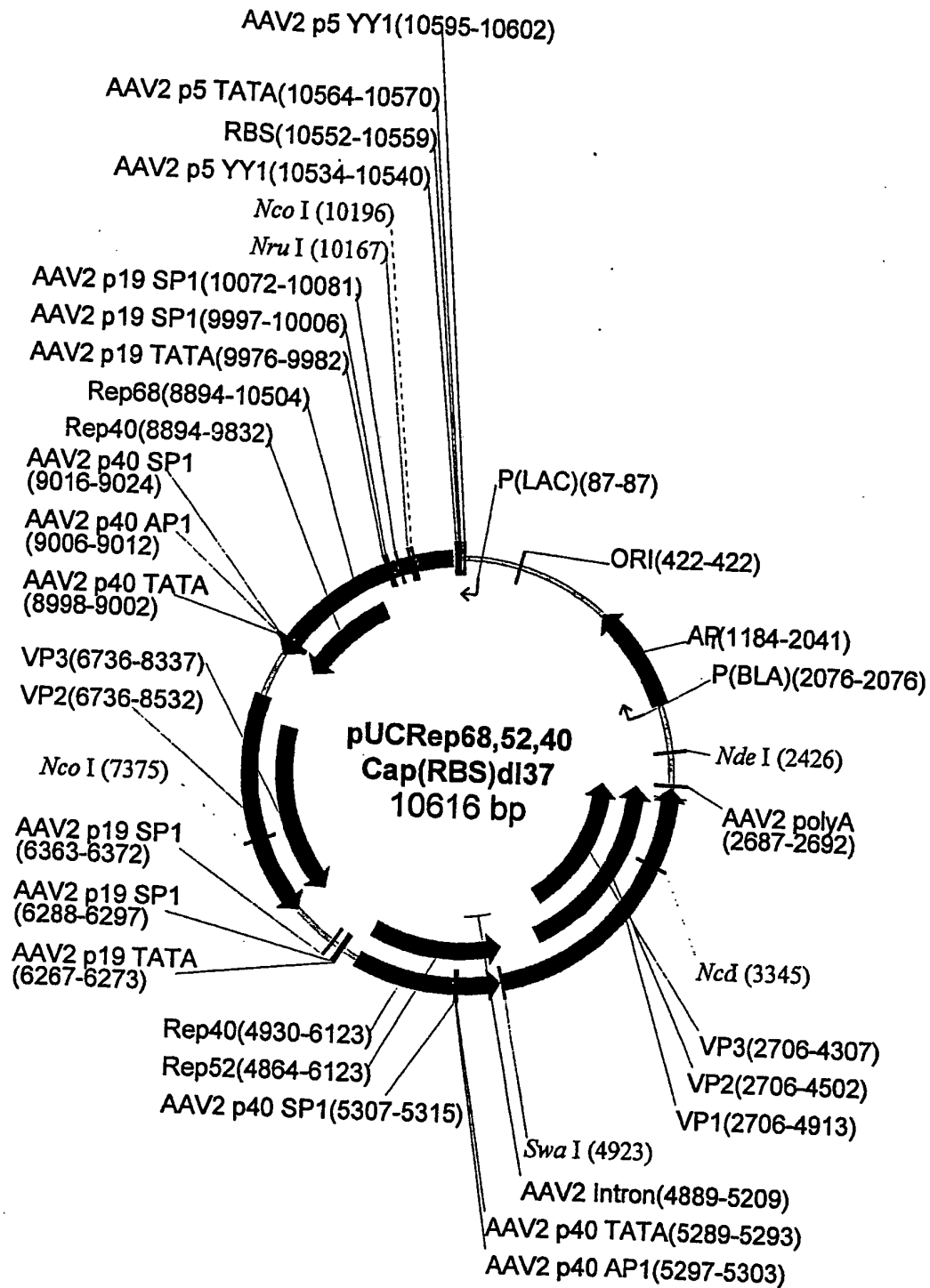


Fig. 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/13532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/86 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 01834 A (HEILBRONN REGINE ;SCHETTER CHRISTIAN (DE)) 13 January 2000 (2000-01-13) the whole document	2,14-18
X	WO 01 55361 A (CHIRON CORP ;HARDY STEPHEN F (US)) 2 August 2001 (2001-08-02) the whole document	2,14-17
A	YOUNG WON-BIN ET AL: "Chimeric retroviral helper virus and picornavirus IRES sequence to eliminate DNA methylation for improved retroviral packaging cells." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 11, June 2000 (2000-06), pages 5242-5249, XP002235189 ISSN: 0022-538X the whole document	1-21



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 March 2003

Date of mailing of the international search report

01/04/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wimmer, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/13532

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0001834	A	13-01-2000	DE 19830141 A1	13-01-2000
			CA 2332623 A1	13-01-2000
			WO 0001834 A1	13-01-2000
			EP 1093524 A1	25-04-2001
			JP 2002519068 T	02-07-2002
WO 0155361	A	02-08-2001	AU 3459701 A	07-08-2001
			EP 1257656 A2	20-11-2002
			WO 0155361 A2	02-08-2001
			US 2002058325 A1	16-05-2002

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13532

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/86 C12N5/10

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, PAJ, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 00 01834 A (HEILBRONN REGINE ;SCHETTER CHRISTIAN (DE)) 13. Januar 2000 (2000-01-13) das ganze Dokument	2,14-18
X	WO 01 55361 A (CHIRON CORP ;HARDY STEPHEN F (US)) 2. August 2001 (2001-08-02) das ganze Dokument	2,14-17
A	YOUNG WON-BIN ET AL: "Chimeric retroviral helper virus and picornavirus IRES sequence to eliminate DNA methylation for improved retroviral packaging cells." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 74, Nr. 11, Juni 2000 (2000-06), Seiten 5242-5249, XP002235189 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument	1-21

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"g" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. März 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/04/2003

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Wimmer, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/13532

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0001834 A	13-01-2000	DE 19830141 A1	13-01-2000
		CA 2332623 A1	13-01-2000
		WO 0001834 A1	13-01-2000
		EP 1093524 A1	25-04-2001
		JP 2002519068 T	02-07-2002
WO 0155361 A	02-08-2001	AU 3459701 A	07-08-2001
		EP 1257656 A2	20-11-2002
		WO 0155361 A2	02-08-2001
		US 2002058325 A1	16-05-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)